

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS –  
PGN**

**DENISE AVANI BITTENCOURT**

**ANÁLISE DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO E  
AUTORRENOVAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina Federal de Santa como requisito para a obtenção do título de Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dr. Andrea Gonçalves Trentin.

Florianópolis,  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bittencourt , Denise Avani  
Análise do potencial de diferenciação e autorrenovação das  
células da crista neural. / Denise Avani Bittencourt ;  
orientadora, Andrea Gonçalves Trentin. - Florianópolis, SC,  
2013.  
94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

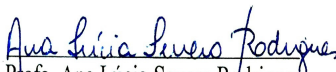
1. Neurociências. 2. Crista Neural.. 3. Célula Tronco..  
4. Diferenciação celular.. 5. PGF2 e EGF.. I. Trentin.,  
Andrea Gonçalves . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III.  
Título.

DENISE AVANI BITTENCOURT

**ANÁLISE DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO E  
AUTORRENOVAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

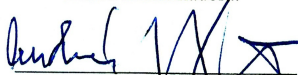
Florianópolis, 27 de Junho de 2013.



Profª. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:




Profª. Andréa Gonçalves Trentin

Orientadora – UFSC



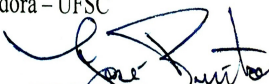
Profª. Evelise Maria Nazari

Membro - UFSC



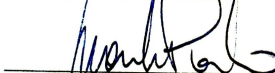
Prof. Marcelo Farina

Membro - UFSC



Prof. José Marques de B. Neto

Membro da Banca Externa



Profª. Marimélia A. Porcionatto

Membro da Banca Externa



Prof. Ricardo Castilho Garcez

Membro - UFSC

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

A crista neural (CN) corresponde a uma população de células que se origina na região dorsal do tubo neural de embriões de vertebrados durante a neurulação. Durante este processo, as células da ectoderme sofrem transição do fenótipo epitelial para o mesenquimal, tornando-se migratórias, e se destinam a povoar vários órgãos e tecidos em desenvolvimento. As regiões que são povoadas por estas células, ao longo do eixo antero-posterior do embrião, formam subdivisões: cranial, vagal, truncal e sacral e produzem uma enorme variedade de derivados, incluindo neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, melanócitos, células endócrinas e glandulares além de tecidos esqueléticos e conjuntivo da cabeça, face e pescoço, além das meninges cerebrais. Assim, a CN é composta de populações de precursores já determinados e de células multipotentes. Células com características da CN podem também ser encontradas em tecidos adultos como, no nervo ciático, nos gânglios da raiz dorsal, intestino, córnea, coração, medula óssea e pele. Na pele de mamíferos, essas células residem em um discreto microambiente conhecido como a saliência do folículo piloso (bulge). O destino dos precursores multipotentes depende de vários fatores e o microambiente exerce papel fundamental neste processo. Fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF2) e o fator de crescimento epidermal (EGF), têm sido identificados como importantes em direcionar a diferenciação de progenitores multipotentes da CN. Nesse estudo, verificamos que o FGF2 promove a renovação e proliferação dos precursores mais indiferenciados e multipotentes da CN de embriões de codorna mantendo-os indiferenciados. FGF2 promove ainda a autorrenovação do precursor bipotente de glia e músculo liso, ao mesmo tempo em que estimula programas de diferenciação celular para as linhagens glial e neuronal em detrimento da diferenciação melanocítica. No entanto, a diferenciação terminal só ocorre após a remoção de FGF2. Além disso, aperfeiçoamos protocolo de isolamento e cultivo de células semelhantes à CN de folículos pilosos das vibrissas de camundongos. Essas células apresentam morfologia semelhante à CN embrionária e expressam os marcadores de CN Pax3, Slug, Snail, Sox10 e p75. O tratamento com FGF2/EGF estimula a proliferação e diferenciação das células

folículo piloso para os fenótipos adipogênico, osteogênico, melanocítico, neural e muscular liso quando em condições específicas de cultivo. Em conjunto, os resultados sugerem que existam populações celulares com características multipotentes no folículo piloso murino, dentre elas células semelhante à CN.

**Palavras-chave:** Crista Neural. FGF2. EGF. célula tronco. Diferenciação celular.

## ABSTRACT

The neural crest (NC) corresponds to a population of cells, which originates in the dorsal neural tube during neurulation. These cells undergo an epithelial-mesenchymal transition, becoming migratory, and populate various organs and tissues in development. The regions, along the anterior-posterior axis of the embryo that are populated by NC cells are classified in cranial, vagal, truncal and sacral and produce a variety of derivatives, including neurons and glial cells of the peripheral nervous system, melanocytes, endocrine and glandular cells in addition to the skeletal and connective tissues of the head, face and neck, and the cerebral meninges. Therefore, NC contains precursors and multipotent cells. In addition, NC-like cells were found in adult tissues, such as sciatic nerve, dorsal root ganglia, intestine, cornea, heart, bone marrow and skin. In mammalian skin, NC-like cells reside in the bulge. The fate of NC precursors is profoundly influenced by microenvironmental factors, such as fibroblast growth factor 2 (FGF2) and epidermal growth factor (EGF). In this study, we found that FGF2 promotes the renewal and proliferation of multipotent NC precursors keeping them undifferentiated. FGF2 also promotes the self-renewal of the glial and smooth muscle bipotent precursors, and stimulates differentiation to the neuronal and glial lineages at the expense of melanocytic one. However, removal of FGF2 is necessary for terminal differentiation. In addition, we improved protocol for isolation and culture of murine hair follicle. These cells have a NC-like morphology and express the NC markers *Pax3*, *Slug*, *Snail*, *Sox 10* and *p75*. In addition, FGF2/EGF treatment stimulates the proliferation of hair follicle cells and their differentiation to adipogenic, osteogenic, melanocytic, neuronal and smooth muscle phenotypes when in specific culture conditions. The results suggest that there are different multipotent cell populations in murine hair follicle among then cells similar to the embryonic NC.

**Keywords:** Neural Crest. FGF2. EGF. cell differentiation. stem cell.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A formação da CN acontece durante o processo de neurulação.....	21
Figura 2 - Mapa de destino dos fenótipos derivados da CN ao longo do eixo céfalo-caudal de embrião de aves. ....	23
Figura 3 - Diagrama esquemático das rotas de migração das células da CNT.....	24
Figura 4 - Vias de sinalização envolvidas na indução da CN. ..	26
Figura 5 - Células osteogênicas da CN cefálica são multipotentes e os alvos do Shh.....	28
Figura 6 - Células-tronco da CN pós-migratória. Células-tronco da CN têm sido isoladas e identificadas em fases pós-migratórias de desenvolvimento, tecidos pós-natais e mesmo em órgãos adultos. ....	32
Figura 7 - Autorrenovação das células da CN.....	54
Figura 8 - Migração e adesão das células do folículo piloso ( <i>bulge</i> ). ....	56
Figura 9 - Análise de expressão gênica em células do folículo piloso ( <i>bulge</i> ).....	57
Figura 10 - Fotografias representativas de imunofluorescência para nestina e p75 em células do folículo piloso. ....	58
Figura 11 - Ensaio de proliferação celular nas culturas secundárias do folículo piloso através de incorporação de BrdU. ....	60
Figura 12 - Análises de expressão gênica por RT-PCR em culturas secundárias do folículo piloso. ....	61
Figura 13 - Fotografias representativas de imunofluorescência em células do folículo subcultivadas na presença dos fatores de crescimento FGF2 e EGF. ....	62
Figura 14 - Efeito do FGF2 e EGF na expressão de células do folículo piloso ( <i>bulge</i> ). ....	63
Figura 15 - Fotografias representativas de imunofluorescência para células do folículo piloso.....	65
Figura 16 - Fotografias representativas de imunofluorescência para p75 em células do folículo piloso.....	66
Figura 17 - Efeito do FGF2 e EGF na expressão de células positivas para p75 do folículo piloso ( <i>bulge</i> ) em culturas secundárias. ....	67



## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Listagem dos anticorpos utilizados nas análises de Imunofluorescência. ....	46
Tabela 2 - Análise fenotípica de derivados da CN sob o efeito do FGF2. ....	49
Tabela 3 - Análise fenotípica dos precursores da CNT sob o efeito de FGF2 .....	51
Tabela 4 - Propagação dos precursores da CN. ....	53
Tabela 5 - Análise clonal das culturas do folículo piloso com relação à expressão de p75.....	68



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
ANOVA	Análise de Variância de uma Via
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	Crista Neural
CNC	Crista Neural Cefálica
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
ET3	Endotelina-3
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EDTA	<i>Etilanodiamino tetra-acetic acid</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	<i>Fluorescein Isotiocianate</i>
LACERT	Laboratório de Células Tronco e Regeneração
LNGFR	Tecidual <i>Low affinity nerve growth factor receptor</i>
Ig	Imunoglobulina
MEC	Matriz Extracelular
MeIEM	<i>Melanocyte Earlier Marker</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBS Triton	PBS contendo 0,25% de Triton X100
PBS Tween	PBS contendo 0,05% de Tween 20
P0	Proteína 0
RA	<i>Retinoic Acid</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
SMA	<i>Smooth Muscle Actin</i>
T3	3-3'-5 triiodo-L-thironina
TXRD	<i>Texas Red</i>



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$^{\circ}$	Grau
%	Por cento
$\chi^2$	Ki quadrado
ng	Nanogramas
mg	Miligramas
<	Procedência menor





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1	CRISTA NEURAL .....	21
1.2	FORMAÇÃO DA CN .....	25
1.3	MULTIPOTENCIALIDADE DA CN.....	27
1.4	CÉLULAS DA CN PÓS-MIGRATÓRIA .....	31
1.5	FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO TIPO 2 (FGF2) E FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) .....	33
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	GERAL .....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1	CULTURAS DE CÉLULAS DA CN DE EMBRIÕES DE CODORNA .....	41
4.1.1	<b>Culturas Primárias .....</b>	<b>41</b>
4.1.2	<b>Culturas Secundárias e Tratamento com FGF2 .....</b>	<b>41</b>
4.1.3	<b>Clonagens Celulares.....</b>	<b>42</b>
4.2	CULTURAS DE CÉLULAS DE FOLÍCULO PILOSO DE VIBRISSAS DE CAMUNDONGOS .....	42
4.2.1	<b>Culturas Primárias .....</b>	<b>42</b>
4.2.2	<b>Culturas Secundárias e Tratamento com FGF2 e EGF....</b>	<b>43</b>
4.2.3	<b>Diferenciação Celular .....</b>	<b>43</b>
4.2.4	<b>Clonagens Celulares.....</b>	<b>44</b>
4.3	ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	45
4.3.1	<b>Análise Fenotípica e Imunocitoquímica.....</b>	<b>45</b>
4.3.2	<b>RT-PCR Semiquantitativo.....</b>	<b>47</b>
4.4	Análise Estatística.....	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
5.1	FGF2 INFLUENCIA A POTENCIALIDADE DA CN EMBRIONÁRIA DE CODORNA.....	49

5.2	FGF2 PROMOVE A AUTORRENOVAÇÃO DE PROGENITORES INTERMEDIÁRIOS DA CN EMBRIONÁRIA DE CODORNA .....	52
5.3	O FOLÍCULO PILOSO DE CAMUNDONGO É UM POTENCIAL NICHOS DE CÉLULAS-TRONCO DA CN .....	55
5.4	FGF2 E EGF INFLUENCIAM A PROLIFERAÇÃO E O POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DO FOLÍCULO PILOSO DE CAMUNDONGO .....	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
6.1	FGF2 INFLUENCIA A DIFERENCIAÇÃO, POTENCIALIDADE E RENOVACÃO DAS CÉLULAS DA CN EMBRIONÁRIA DE CODORNAS .....	70
6.2	CN PÓS-MIGRATÓRIA DE FOLÍCULO PILOSO MURINO: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO .....	72
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>



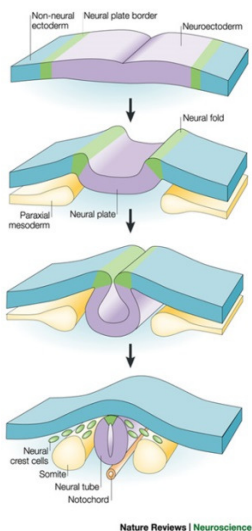
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CRISTA NEURAL

A crista neural (CN) corresponde a uma população de células multipotentes que se origina na região dorsal do tubo neural de vertebrados durante o processo de neurulação. No momento em que ocorre o fechamento do tubo neural, as células localizadas nas pregas neurais sofrem transição epitélio-mesenquimal e desprendem-se do neuroepitélio de origem, assumindo caráter migratório (Figura 1).

As células da CN seguem então por caminhos migratórios distintos, povoando vários órgãos e tecidos em desenvolvimento (para revisão ver LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; HALL, 2009).

Figura 1 - A formação da CN acontece durante o processo de neurulação.



Nature Reviews | Neuroscience

Fonte: Gammill e Bronner-Fraser (2003).

A borda da placa neural (verde) é induzida pela sinalização entre a neuroectoderma (roxo) e do ectoderma não-neural (azul) e da mesoderme paraxial subjacente (amarelo). Durante neurulação, as

bordas da placa neural (dobras neurais) elevam-se. As células da CN (verde) delaminam das dobras neurais ou do tubo neural dorsal (mostrado), dependendo da espécie e do nível axial.

As rotas migratórias das células da CN variam quanto à sua posição de origem ao longo do eixo antero-posterior embrionário sendo dividida em domínios funcionais que se sobrepõem em certos trechos: região cefálica, vagal, cardíaca, truncal e sacral (GILBERT, 2000).

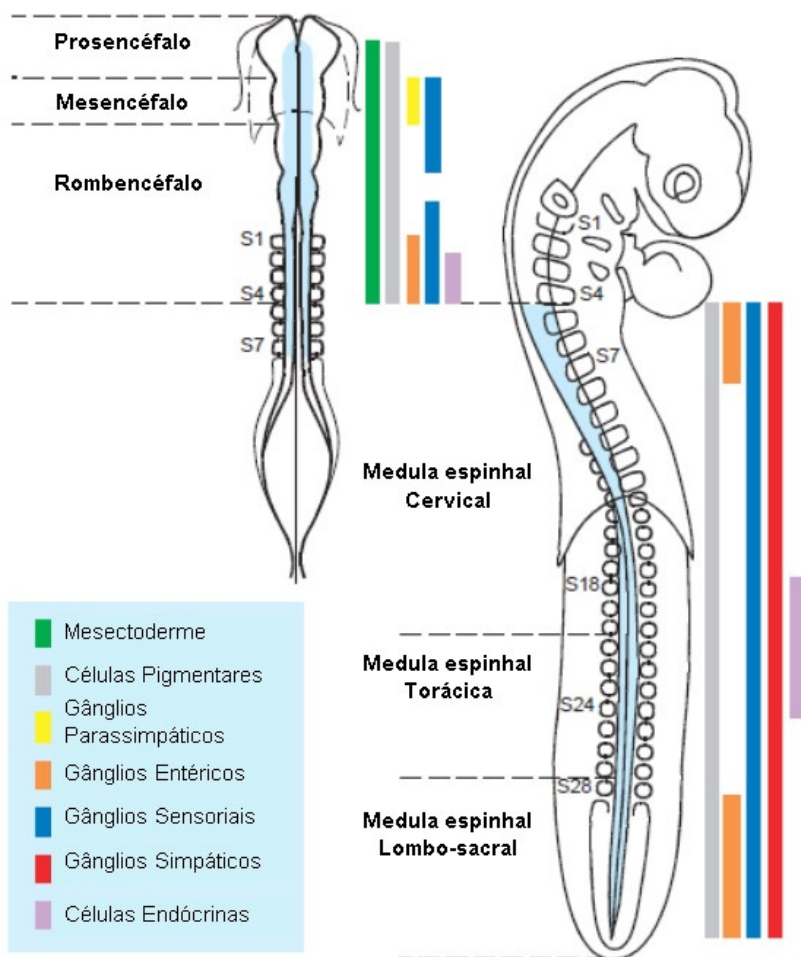
Na região cefálica, a CN dá origem à maioria dos ossos, cartilagem, derme facial, tecido adiposo, tecido conjuntivo associado com os músculos, glândulas e células do músculo liso.

As células da CN vagal, que também fazem parte da região cefálica, e as células da região sacral contribuem para a formação do sistema nervoso entérico.

A CN cardíaca, por sua vez, corresponde à região caudal da CN cefálica, e origina os septos cardíacos, que separa a circulação pulmonar da aórtica, assim como melanócitos, músculo liso do arco aórtico e gânglios parassimpáticos cardíacos (SNIDER et al., 2007; DUPIN, et al., 2010).

Por fim, e não menos importante, temos as células da CN da região truncal que dão origem a neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, assim como melanócitos da pele (Figura 2).

Figura 2 - Mapa de destino dos fenótipos derivados da CN ao longo do eixo céfalo-caudal de embrião de aves.



Fonte: Adaptado de LE DOUARIN *et al.*; (2004).

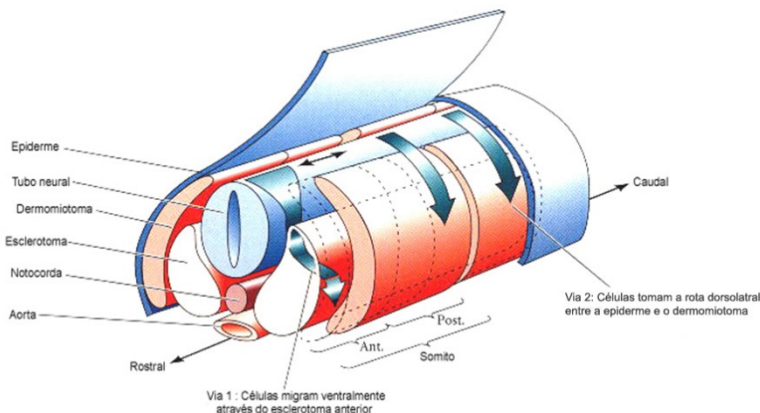
Os fenótipos celulares gerados pela CN em diferentes níveis antero-posteriores da dobra neural (azul claro) são mostrados em embriões de galinha de 7 (esquerda) e 28 (à direita) somitos (S). À esquerda, tecidos que surgem da CN céfálica; à direita, tecidos que surgem da CN troncual subdividida nas regiões cervical, torácica e lombo-sacral da medula vertebral. A região que dá origem a mesectoderme (verde) estende-se

desde o nível do prosencéfalo até o rombômero (r) 8 (correspondente a S4). Melanócitos (cinza) são produzidas ao longo de todo o eixo céfalo-caudal. O gânglio parassimpático ciliar (amarelo) deriva da CN mesencefálica. Gânglios entéricos (cor de laranja) decorrem tanto da CN vagal (S1-S7) quanto lombo-sacral (posterior ao S28). Da medula espinal cervical S4 à caudal, são produzidos gânglios simpáticos (vermelho) do sistema nervoso periférico, enquanto os gânglios sensoriais (azul escuro) são gerados a níveis mesencéfalos e romboencefálicos até os níveis lombo-sacrais da CN. Células endócrinas (violeta) provêm níveis de S2-S4 e S18-S24 da CN.

As células da CN truncal (CNT) possuem duas vias distintas de migração no embrião.

O primeiro grupo de células migra ventralmente e origina neurônios sensoriais e simpáticos e células gliais. O segundo grupo de células migra mais tardiamente no sentido dorsolateral, originando os melanócitos da pele (Figura 3) (para revisão ver LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; BAREMBAUM & BRONNER-FRASER, 2005).

Figura 3 - Diagrama esquemático das rotas de migração das células da CNT.



Fonte: Adaptado de Gilbert (2003).

Via 1 (caminho ventral): as células migram ventralmente através do esclerotoma anterior (a porção do somito que origina a cartilagem vertebral). Estas células inicialmente saem da porção posterior do esclerotoma migram ao longo do tubo neural indo para a região anterior



oposta e contribuem para os gânglios simpáticos e parassimpáticos bem como, para células medulares adrenais e gânglios da rota dorsal. Pouco tempo depois outras células da CNT entram na Via 2 (o caminho dorsolateral) e migram ao longo da rota dorsolateral, abaixo da ectoderme e tornam-se melanócitos produtores de pigmentos.

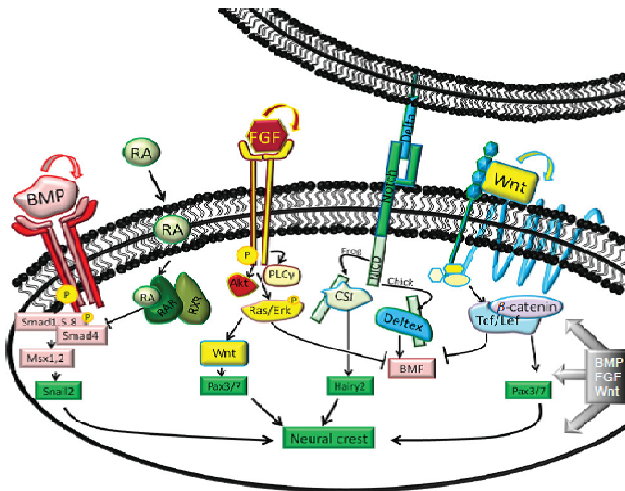
## 1.2 FORMAÇÃO DA CN

Uma cascata de eventos moleculares está envolvida em estabelecer as características migratórias e multipotentes das células da CN. Inicialmente ocorre a indução da CN a partir da ectoderme envolvendo vários passos de sinalização celular ao longo dos eixos médio-lateral e antero-posterior do embrião. Os sinais que posicionam as células da CN ao longo destes eixos são liberados pela placa neural, pela epiderme e pela mesoderme lateral.

Estudos em embriões de anfíbios indicam que a placa neural e a epiderme são especificadas por um aumento progressivo dos níveis da proteína morfogênica do osso (BMP). Embora a atividade de BMP seja requerida para a indução da CN em aves e anfíbios, esta molécula não é suficiente para induzir a formação da placa neural ou as células da CN.

Um segundo grupo de sinais envolvidos na formação da CN são as moléculas Wnts, o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o ácido retinóico (RA) (Figura 4) (BAREMBAUM & BRONNER – FRASER, 2005; STEVENTON *et al.*, 2005).

Figura 4 - Vias de sinalização envolvidas na indução da CN.



Fonte: Rogers *et al.* (2012).

Da esquerda para a direita: BMP ativa proteínas Smad 1,5,8 que interagem com o co-Smad para ativar a transcrição de *Msx1,2* a borda da placa neural e os genes especificadores da CN (*Snail2*). Ácido retinóico (RA) atua como um regulador da transcrição de tecidos neurais posteriores, e inibe a sinalização de BMP e da expressão de FGF8 e Wnt8. FGF sinaliza através de um de seus três caminhos (Akt, PLCγ, Ras/ERK) a ativação da expressão de Wnt ou inibindo a expressão de BMP e indiretamente regulando o desenvolvimento da CN. Interações Notch/Delta ativam o domínio intracelular Notch, que então se liga aos fatores de transcrição CSL para ativar a expressão do gene de transcrição da borda da placa neural *Hairy2* (rãs) ou ativa a expressão de BMP, indiretamente induzindo a CN (aves). Wnt liga-se aos receptores de frizzled e LRP5/6, o que permite a acumulação de β-catenina na célula. β-catenina se liga ao efetor Wnt TCF/LEF o qual ativa o gene a borda da placa neural *PAX3/7*, que consequentemente ativa os genes da CN. Setas em cinza indicam a necessidade constante destas vias de sinalização ao longo do desenvolvimento da CN.

O processo de formação da CN envolve ainda outros módulos regulatórios através de uma regulação positiva de especificadores na fronteira da placa neural. Um destes módulos é constituído por fatores de transcrição como *Msx*, *PAX3/7*, e

Zic1. Estes são expressos na borda da placa neural, bem como nos domínios vizinhos. Estes especificadores da borda da placa neural são expressos amplamente e têm função na formação da CN e, mais tarde, apresentam expressão diminuída na CN migratória.

O refinamento da região da borda da placa neural resulta da cooperação entre o módulo de sinalização extracelular e o módulo especificador da borda da placa neural que ativa os genes especificadores da CN.

Os genes deste módulo incluem fatores de transcrição como Snail/Slug, FoxD3, Id, cMyc, e Sox9/10, todos expressos em células pré e migratória da CN. Estes genes conferem a capacidade de transição epitélio-mesenquimal, permitindo que as células da CN deixem o tubo neural, migrem e em seguida diferenciem-se em diversos derivados. Estes genes são ativados por Wnt em conjunto com marcadores da borda da placa neural, Zic, Msx1/2 e PAX3/7, e reprimem a expressão do gene Sox2 no tubo neural.

Outros genes especificadores da CN controlam a expressão de genes efetores que medeiam adesão e motilidade celular, tais como caderinas e GTPases Rho. Eles também atuam na especificação das várias linhagens da CN. Muitas vezes, os mesmos fatores de transcrição que atuam no início da especificação da CN, posteriormente também controlam um ou mais programas de diferenciação da CN.

Um exemplo é o SOX10, envolvido na diferenciação de melanócitos, e nas linhagens sensoriais, autonômicas e gliais. Seu parálogo, Sox9, por sua vez, é responsável pela diferenciação de condrócitos (BRONNER & LE DOUARIN, 2012; NIE & BRONNER, 2012).

### 1.3 MULTIPOTENCIALIDADE DA CN

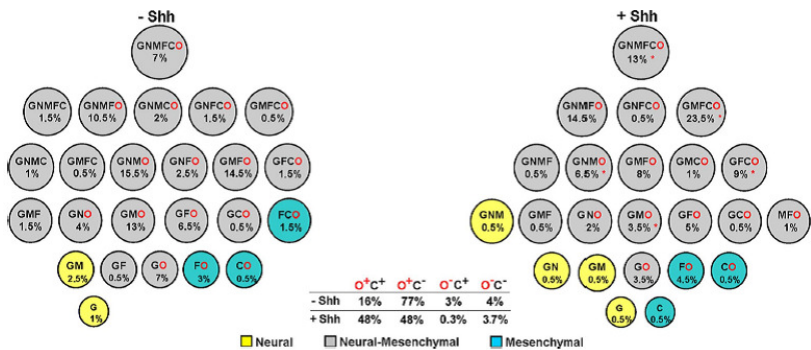
O destino de diferenciação das células da CN depende de vários fatores, dentre eles, a região de onde emergem (cefálica, vagal, cardíaca, truncal ou sacral), as rotas migratórias adotadas e o local onde permanecerão. Os sinais do microambiente exercem papel fundamental na diferenciação dessas células (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999). Dados do nosso laboratório (LACERT/UFSC) demonstraram que a matriz extracelular (MEC) influencia vários aspectos da morfogênese da CN, como

migração, proliferação e diferenciação celular, e que seu efeito é similar em aves e mamíferos. A proteína da MEC, fibronectina, promove a diferenciação da CN para o fenótipo muscular liso aumentando a sobrevida e instruindo os progenitores oligopotentes (COSTA-SILVA *et al.*, 2009).

Estudos recentes realizados em nosso laboratório investigaram as ações de alguns compostos fenólicos, flavonoides que integram a dieta humana, em células da CN de codornas *in vitro*. Foi demonstrado que os flavonoides hesperidina e rutina aumentam a viabilidade de células da CNT em culturas, sem afetar a proliferação e diferenciação celular. Estes resultados sugerem que os flavonoides hesperidina e rutina promovem a sobrevida das células da CN, o que pode ser útil no controle da toxicidade de compostos químicos durante o desenvolvimento embrionário (NONES *et al.*, 2012).

Estudos *in vivo* e *in vitro* atestaram a multipotencialidade das células da CN. Utilizando ensaios de clonagens celulares, Calloni e colaboradores (2009) identificaram na CN cefálica (CNC) de aves a existência de progenitor hexapotente capaz de originar células gliais, neurônios, melanócitos, células de músculo liso, condrócitos e osteócitos (GNMSCO) (Figura 5). Este progenitor pode ser considerado o progenitor do topo da hierarquia da linhagem da CNC.

Figura 5 - Células osteogênicas da CN cefálica são multipotentes e os alvos do Shh.



Fonte: Calloni *et al.* (2009).

A análise do controle e com tratamento com Shh é resumido em uma esquemática árvore de linhagem no qual os tipos de progenitores são classificados de acordo com o número de tipos celulares e seus progenitores (G, células gliais; N, neurônios; M, melanócitos; F, células de músculo liso; C, condrócitos; e O em vermelho, osteoblastos). A frequência de cada tipo de progenitor (porcentagem de clones) é mostrada em ambas condições, e os asteriscos em vermelho indicam aqueles modificados pelo tratamento com Shh (\*  $P < 0.05$ ). Em ambas as condições, progenitores dotados de ambos potenciais mesenquimal (F,C,O) e neural (G,N,M) (em cinza) produzem células somente com potencial neural (em amarelo) ou mesenquimal (em azul). A tabela resume a frequência do progenitor respectivo aos potenciais condrogênico (C) e osteogênico (O), o qual define progenitores da CN cefálica não esqueletogênicos (O-C) e 3 tipos de progenitores esqueletogênicos: osteo-condrogênico (O+C+), osteogênico não-condrogênico (O+C-) e condrogênico não-osteogênico (O- C+).

Além disso, fatores solúveis influenciam a diferenciação e autorrenovação dos progenitores da CN. Em trabalho recente foi demonstrado que o Sonic Hedgehog (Shh) influencia a diferenciação de condrócitos em culturas de células da CN cefálica e truncal de codornas. Shh promoveu o aumento do número de progenitores com potencialidade mesenquimal e neural. Além disso, Shh promoveu a diminuição dos precursores neurais mais restritos sem afetar a sobrevivência e proliferação das células da CN. Em muitos destes progenitores neurais, Shh é capaz de revelar uma potencialidade, que não está completamente perdida, dando origem a derivados mesenquimais. Estes dados mostraram que o Shh possui um efeito positivo na expressão de fenótipos mesenquimais (CALLONI *et al.*, 2007).

Em adição, estudos de clonagens de células de pigmento e seus progenitores demonstraram a capacidade de conversão fenotípica de células derivadas da CN de aves. Células gliais isoladas de nervo ciático são capazes de se converter em células de pigmento e vice-versa, gerando um tipo celular intermediário a qual expressa marcadores específicos de ambas as linhagens. Nos dois casos, a transição de fenótipo foi estimulada pela presença de endotelina 3 (ET3) e envolveu a reversão de células gliais e melanócitos para um estado bipotente Glia-Melanocítico (GM). Estas investigações demonstram a plasticidade dos

derivados da CN resultando eventualmente numa conversão de fenótipo entre as linhagens celulares devido à recuperação ou manutenção do potencial de diferenciação em resposta a fatores sinalizadores (DUPIN *et al.*, 2001; DUPIN *et al.*, 2003; REAL *et al.*, 2006). Trabalhos realizados por TRENTIN e colaboradores (2004) evidenciaram, também utilizando ET3, em ambas as regiões cefálica e trunca da CN, a capacidade de autorrenovação dos progenitores bipotentes glia-melanócito (GM) e glia-músculo liso (GS), podendo então este grupo de células ser considerado células-tronco (TRENTIN *et al.*, 2004).

Em estudo recente, demonstramos que o EGF tem um importante papel no processo de diferenciação de células da CNT para neurônios e melanócitos, enquanto o FGF2 atua na diferenciação para o fenótipo glial. Porém, o tratamento concomitante de FGF2 e EGF não estimula diferenciação glial nem a melanocítica. Esses resultados indicam que o EGF possivelmente atua como um antagonista do efeito pró-gliogênico do FGF2, e o FGF2 como antagonista do efeito pró-melanogênico do EGF. Um fato interessante encontrado é que o EGF, mesmo em presença de FGF2, é ainda capaz de determinar a diferenciação neurogênica nas mesmas proporções.

Nesse caso, a ação do EGF não é bloqueada pelo FGF2, como no caso do fenótipo melanocítico, sugerindo um mecanismo regulatório distinto do EGF sobre a diferenciação neuronal (GARCEZ *et al.*, 2009; TEIXEIRA, 2009).

Diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados em embriões de aves e mamíferos demonstraram uma alta capacidade de multipotência, plasticidade, e de autorrenovação das células da CN, atestando a sua natureza verdadeira de célula-tronco. É importante ressaltar que a maioria destas células embrionárias da CN é capaz de se diferenciar em vários fenótipos das duas linhagens neuronais e mesenquimais. Nos últimos anos, células com características de células embrionárias de CN foram observadas em vários órgãos adultos (SANTOS & CARVALHO, 2012).

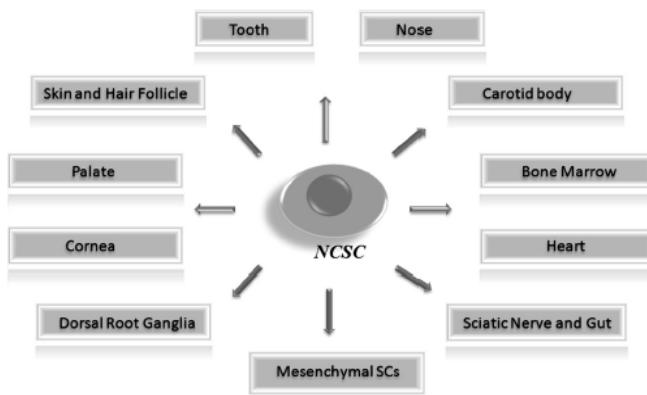
ANDERSON (1989) descreveu as células da CN como um grupo de células-tronco multipotentes, autorrenováveis e com potencialidade gradualmente restrita a sublinhagens em modelo de roedores. As células da CN embrionária e, inclusive a pós-migratória, podem ser expandidas como alternativa para aplicações em diversas patologias. Embora amplamente

estudadas, ainda não está bem estabelecido os mecanismos que regulam a potencialidade diferenciação das células da CN. Portanto, estudar a autorrenovação de células multipotentes da CN é uma alternativa de amplificar estas células sob o controle de fatores externos. Como estes fatores interagem com determinantes intrínsecos em regular a autorrenovação das células-tronco da CN necessita ser compreendido e o conhecimento da real natureza destas células poderá ajudar em aplicações terapêuticas futuras.

#### 1.4 CÉLULAS DA CN PÓS-MIGRATÓRIA

Além da CN recentemente foi demonstrado que mesmo tecidos adultos contêm populações de células multipotentes e autorrenováveis com potencial de desenvolvimento semelhante à CN como, no nervo ciático, nos gânglios da raiz dorsal, intestino, córnea, coração, medula óssea e pele (KRUGER et al., 2002; MILETICH & SHARPE, 2004; DELFINO-MACHIN et al., 2007 (Figura 6). Estas células têm sido isoladas e identificadas em fases distintas de desenvolvimento pós-migratório utilizando (LNGFR ou p75). Estudos em células isoladas (pela expressão do receptor p75) de nervo ciático e intestino de embriões de roedores, e transplantadas em embriões de galinha, originaram células com marcadores característicos de neurônios sensoriais, simpáticos e parassimpáticos e células de Schwann (MORRISON et al., 1999, WHITE et al., 2001; MOSHER et al., 2007). Outros trabalhos, analisando células oriundas dos gânglios da raiz dorsal de ratos adultos, demonstraram que estas são duplamente positivas para nestina e p75 e disparam potencial de multipotencialidade além da capacidade de formar esferas (LI et al., 2007). Estudos adicionais, realizados por YOSHIDA e colegas (2006), isolaram, pela expressão de marcadores da CN migratória, células semelhantes à CN em modelos de roedores adultos, como Twist, Snail, Slug e Sox9. Essas células também possuíam o potencial em diferenciar para neurônios, adipócitos e condrócitos. diferentes marcadores da CN, inclusive pela expressão do receptor de baixa afinidade do fator de crescimento do nervo.

Figura 6 - Células-tronco da CN pós-migratória. Células-tronco da CN têm sido isoladas e identificadas em fases pós-migratórias de desenvolvimento, tecidos pós-natais e mesmo em órgãos adultos.



Fonte: Trentin e Calloni (2012).

Estas células representam uma importante fonte alternativa de células viáveis e autólogas para a medicina regenerativa.

Recentemente, trabalhos do laboratório (LACERT/UFSC) identificaram no ligamento periodontal (COURA *et al.*, 2008), e na polpa dental (POLLI *et al.*, 2013, em submissão) humanos células que apresentaram marcadores de CN, e células com capacidade de diferenciação em derivados mesodermas e neurais. Estes dados sugerem que tanto o ligamento periodontal, como a polpa dental, estruturas derivadas da CN, pode conter ou originar células com propriedades da CN recapitulando sua origem embrionária. Estas estruturas mostraram-se como fontes alternativas e viáveis de células progenitoras para uso promissor em terapias com células-tronco.

Populações de células semelhantes à CN podem ser também encontradas em um local específico da pele de mamíferos, no folículo piloso, onde residem em um discreto microambiente conhecido como a saliência do folículo piloso (*bulge*). O *bulge* corresponde a região que é estabelecida durante a morfogênese, mas não degenera durante o ciclo do cabelo. As células do *bulge* são mais quiescentes que as outras células do folículo (DELFINO-MACHIN *et al.*, 2007) e além de



promover a regeneração do folículo, tem sido sugeridas como um reservatório de células-tronco multipotentes que podem ser recrutadas durante o reparo e regeneração da epiderme (TUMBAR *et al.*, 2004).

Sieber-Blum e colaboradores (2004), utilizando diferentes condições de cultura, encontraram células multipotentes no folículo piloso adulto e as designaram como células-tronco da CN epidermal (EPI-NCSCs). Estas células mostraram um amplo potencial de diferenciação celular, gerando células que expressavam marcadores de neurônios, glia, células do músculo liso, condrócitos e melanócitos. Semelhante às células da CN embrionária, as EPI-NCSCs respondem a neuregulina tipo 1 gerando células de Schwann, e em resposta a BMP-2, formam condrócitos (DELFINO-MACHIN *et al.*, 2007). Além disso, essas células podem ser renovadas e mantidas em estado indiferenciado na presença de fatores de crescimento como o fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF2), fator de crescimento epidermal (EGF), endotelina-3 (ET3) ou Shh por longos períodos de tempo permanecendo multipotentes. Desse modo, pode-se sugerir que o folículo piloso possa conter populações de células tronco da CN (ADOLPHE *et al.*, 2004; TOMA *et al.*, 2005; DELFINO-MACHIN *et al.*, 2007).

### 1.5 FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO TIPO 2 (FGF2) E FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)

O FGF2 é considerado como um fator de crescimento multifuncional devido aos seus efeitos em diversas células e tecidos. KALCHEIM e NEUFELD (1990) demonstraram que este polipeptídeo pode atuar como um fator de sobrevivência para subpopulações não neuronais e pode conduzir a diferenciação celular, promovendo a neurogênese em progenitores da CN em aves. Trabalhos mais recentes têm reportado que o FGF2 pode estimular a gliogênese de células da CN em embriões murinos pela ativação da sinalização de Notch, o qual está relacionado em vários processos biológicos, como diferenciação, proliferação e apoptose (OTA & ITO, 2006).

Recentemente em minha dissertação de mestrado, demonstramos que o fator FGF2 mantém as células da CN num estado indiferenciado e com alta capacidade de proliferação celular ao mesmo tempo em que direciona a potencialidade

dessas células para os fenótipos neuronal e glial havendo necessidade de remoção do fator para a diferenciação terminal. Em adição, FGF2 promove um aumento significativo na proporção dos progenitores mais multipotentes e indiferenciados da CN embrionária de codorna sugerindo que FGF2 esteja envolvido na renovação desses progenitores (BITTENCOURT, 2007).

O fator de crescimento epidermal (EGF), polipeptídeo constituído por 53 resíduos de aminoácidos, possui um importante papel nos processos do desenvolvimento, assim como a família FGF. Os dois fatores, EGF e FGF2, estimulam a proliferação de uma grande variedade de células, inclusive de precursores neurais *in vitro* (KILPATRICK & BARTLETT, 1995). Estudos utilizando ratos *knockout* para receptores de EGF mostraram que estes animais exibem migração anormal das células da CN e sugere-se que a expressão dos receptores de EGF está relacionada com a determinação da via de migração dessa população celular (GOLDIN *et al.*, 2000).

Estudos do nosso laboratório demonstraram que EGF induz a diferenciação das células da CN para o fenótipo neuronal e melanocítico enquanto que o FGF2 estimula a diferenciação para o fenótipo glial. Na presença de ambos os fatores a diferenciação neuronal predomina, quando o tratamento é realizado nas fases iniciais da cultura. Estes resultados sugerem que EGF estimula a neurogênese e a melanogênese, enquanto FGF2 estimula a gliogênese e a combinação desses fatores estimula a neurogênese. Estes experimentos demonstraram que os fatores de crescimento EGF e FGF2, são capazes de modular a diferenciação das células da CN. Esses fatores formam um sistema de determinação dos fenótipos derivados da CN, agindo, dependendo do progenitor envolvido, com efeitos opostos ou sinérgicos na diferenciação de neurônios, células gliais e melanócitos e, possivelmente, atuando de maneira competitiva num progenitor misto glia-melanócito (GARCEZ *et al.*, 2009).

Em contrapartida, estudos posteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o EGF parece não estar envolvido na potencialidade e nem na proliferação dos progenitores da CN podendo atuar no processo de diferenciação final de neurônios e melanócitos derivados da CN (TEIXEIRA, 2011).

Com base nesses dados, pode-se pensar num possível mecanismo de ação coordenado entre EGF e FGF2. Entretanto,

apesar de muito estudado em vários sistemas biológicos, o provável envolvimento do FGF2, bem como o EGF, nos processos de diferenciação das células da CN ainda não está esclarecido.



## 2 JUSTIFICATIVA

O microambiente em que as células se encontram é um fator importante que influencia a plasticidade celular. A combinação de sinais específicos em determinados períodos de tempo como também a sua localização, pode contribuir para aumentar a potencialidade da CN (STEMPLE & ANDERSON, 1992; LE DOUARIN *et al.*, 2004).

Investigações em culturas de células da CN têm demonstrado que fatores de crescimento e de sobrevivência podem interferir no direcionamento do destino celular. Estes fatores, presentes nos sítios onde a célula da CN se encontra, são críticos na escolha da potencialidade (LE DOUARIN *et al.*, 1994).

Estudos de investigação da multipotencialidade e plasticidade da CN confirmaram seu potencial de células-tronco e está bem estabelecido que o microambiente apresenta um importante papel no direcionamento destas células tanto no embrião quanto no animal adulto. No entanto, é necessário investigar sobre a influência que o EGF e o FGF2 exercem sobre o processo de migração, proliferação e diferenciação das células da CN embrionária e principalmente no que tange as células semelhantes a CN provenientes do folículo piloso, *bulge*. Esta afirmação levanta a questão sobre a função dos fatores FGF2 e EGF na potencialidade e renovação das células da CN. Estes estudos podem levar à concretização de abordagens tais como o recrutamento e diferenciação de células-tronco armazenadas em um tecido, ou até mesmo conversão de células já diferenciadas de um determinado tipo para um diferente fenótipo funcional.

O presente trabalho visa à obtenção de informações sobre os aspectos celulares que controlam a potencialidade e autorrenovação das CN embrionária e no potencial de diferenciação de células semelhantes a CN isoladas de folículo piloso. O estudo da morfogênese da CN e sua regulação podem trazer importantes perspectivas para o desenvolvimento de terapias para inúmeras doenças e malformações que afetam as estruturas derivadas da CN. Elucidar os mecanismos que regulam a diferenciação das células da CN é o primeiro passo para uma futura aplicação terapêutica em patologias que envolvam os derivados da CN.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Analisar o potencial de diferenciação e a capacidade de autorrenovação das células da CN embrionária e de células com características de CN de folículo piloso, investigando o efeito dos fatores de crescimento FGF2 e EGF.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar o efeito de FGF2 na potencialidade e diferenciação das células da CN de embriões de codorna, avaliando a ocorrência de progenitores multipotentes utilizando clonagens celulares;
- Avaliar o efeito de FGF2 na autorrenovação das células da CN de embriões de codorna através de subclonagens celulares;
- Aperfeiçoar protocolo de isolamento e cultivo de células semelhantes à CN em folículo piloso de vibrissas de camundongos adultos;
- Identificar e caracterizar a presença de células semelhantes à CN em folículo piloso de vibrissas de camundongos adultos;
- Avaliar o efeito de FGF2 e EGF na proliferação, diferenciação e potencialidade das células semelhantes à CN isoladas de folículo piloso de camundongos adultos;
- Investigar a potencialidade semelhante à CN através de ensaios clonais isolando as em células do folículo piloso através do marcador p75 (células indiferenciadas da CN).





## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 CULTURAS DE CÉLULAS DA CN DE EMBRIÕES DE CODORNA**

#### **4.1.1 Culturas Primárias**

Foram utilizados em média 30 embriões de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) por experimento, nos estágios de desenvolvimento de 18-25 somitos (estágios 15/16 HAMBURGUER & HAMILTON, 1951) obtidos no biotério setorial do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) da UFSC.

Todos os procedimentos descritos estão de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UFSC (protocolo 103/CEUA/UFSC). As culturas primárias foram realizadas como descrito previamente (TRENTIN et al., 2004), com algumas modificações. Inicialmente, foram isolados explantes de tubo neural da região truncal de embriões de codorna. Os explantes foram colocados em placas de cultura de 35 mm (Corning) e mantidos em meio de cultura Mínimo Essencial Modificado Alfa ( $\alpha$ -MEM) (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultlab) e 2% de extrato de embrião de galinha (EE). Nos experimentos foi utilizado meio complexo para diferenciação celular:  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de SBF, 2% de EE e hormônios e fatores de crescimento [transferrina (10mg/mL), hidrocortisona (0,1mg/mL), glucagon (0,01ng/mL), insulina (1ng/mL), T3 (triiodotironina) (0,4ng/mL), EGF (0,1ng/mL), FGF2 (1ng/mL) (todos Sigma)]. A cultura foi mantida em estufa úmida a 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

#### **4.1.2 Culturas Secundárias e Tratamento com FGF2**

Após 24 horas de cultivo, os tubos neurais foram removidos e descartados e as células da CN remanescentes,

descoladas com solução de tripsina a 0,25% (Sigma) e ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,02% (EDTA, Vetec) em tampão fosfato salina (PBS) e recuperadas através de bloqueio em meio contendo 10% SBF seguido de centrifugação (500 X g por 10 minutos). Para a realização das culturas secundárias, foram semeadas 400 células/poço em placas de 96 poços (Corning) revestidas com colágeno tipo I (50ug/mL) (Sigma) e mantidas com meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de SBF, 2% EE e acrescido ou não de FGF2 (10ng/mL) (Sigma) durante 6 dias e depois por mais 4 dias em meio complexo.

#### **4.1.3 Clonagens Celulares**

As culturas clonais foram realizadas como descrito previamente (TRENTIN *et al.*, 2004), para análise dos efeitos de FGF2 sobre a potencialidade dos progenitores da CN. Para tanto as células provenientes da cultura primária foram semeadas individualmente sob controle microscópico em placas de 96 poços previamente revestidas com colágeno I e mantidas na presença ou não de FGF2 a uma concentração de 10ng/mL durante 6 dias e depois por mais 4 dias no meio complexo.

### **4.2 CULTURAS DE CÉLULAS DE FOLÍCULO PILOSO DE VIBRISSAS DE CAMUNDONGOS**

#### **4.2.1 Culturas Primárias**

Foram utilizados camundongos adultos da linhagem C57BL/6, com idade entre 8 e 10 semanas, obtidos no biotério setorial do LACERT. Todos os procedimentos descritos estão de acordo com os princípios éticos adotados pelo COBEA, e aprovados pela CEUA/UFSC (protocolo 323/CEUAUFSC). O procedimento utilizado para o isolamento das células é uma modificação descrita previamente (SIEBER-BLUM *et al.*, 2004; PEREIRA, 2011).

Brevemente, os animais foram sacrificados e a pele em torno das vibrissas removida. Sob observação em microscópio estereoscópico, os folículos pilosos foram individualizados e a cápsula de colágeno que os reveste foi retirada. Logo em seguida foi realizada uma transecção acima e abaixo da região do *bulge*. Os explantes do *bulge* foram então colocados em

placas de cultura 35 mm (Corning), previamente revestidas com Colágeno I (50ug/mL) (Sigma), e pré-incubados durante 16 horas para adesão ao substrato.

Logo após esse período, adicionou-se 1,5 mL de meio de cultura, o qual consiste de  $\alpha$ -MEM acrescido de 15% de SBF, suplementado ou não com os fatores FGF2 e EGF (40ng/mL e 20ng/mL respectivamente) que permitiram o enriquecimento das células da CN, sendo este renovado a cada três dias. No quinto dia, células começaram a emigrar dos explantes e, no décimo quarto, esses foram removidos e as células aderidas foram isoladas para análise por RT-PCR ou fixadas e analisadas por imunofluorescência, conforme descrito abaixo. A cultura foi crescida em estufa úmida à 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

#### **4.2.2 Culturas Secundárias e Tratamento com FGF2 e EGF**

Para realização das culturas secundárias, os explantes do folículo piloso foram removidos após 14 dias de cultivo, e as células remanescentes descoladas da placa com solução tripsina-EDTA (Sigma). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (500 X g por 10 minutos) e replaqueadas a uma densidade de 50 células/poço em placas de 96 poços previamente revestidas com Colágeno tipo I (50ug/mL) (Sigma). Após 1 hora de incubação, adicionou-se aos poços 0,15 mL dos meios de cultivo, que consistiam de  $\alpha$ -MEM acrescido de 15% de SBF suplementado ou não com EGF (20ng/mL) e FGF2 (40ng/mL). As culturas foram mantidas por mais sete dias, a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade com renovação do meio de cultivo a cada três dias. Após o período, seguiram-se as análises de RT-PCR, imunofluorescência e de proliferação celular.

#### **4.2.3 Diferenciação Celular**

Para avaliar uma possível diferenciação em fenótipos neurais e mesenquimais, foram realizadas inicialmente culturas primárias mantidas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM acrescido de 15% de SBF suplementado com EGF (20ng/mL) e FGF2 (40ng/mL) durante 14 dias.

A seguir as células foram tripsinizadas e plaqueadas em meios de diferenciação específicos: neuronal (meio neurobasal, Invitrogen); glial ( $\alpha$ -MEM, 10% SFB, neuregulina tipo 1 a 10ng/mL); adipogênica ( $\alpha$ -MEM, 10% SBF, insulina a 2,5 $\mu$ g/mL, indometacina, a 100 $\mu$ M, dexametasona a 10<sup>-8</sup> M, todos Sigma); osteogênica ( $\alpha$ -MEM, 10% SFB  $\beta$ -glicerol-fosfato, a 3,15mg/mL, ácido ascórbico a 5 $\mu$ g/mL, dexametasona, a 10<sup>-8</sup> M, todos Sigma); melanocítica ( $\alpha$ -MEM, 10% SFB, fator de célula-tronco, SCF a 50  $\mu$ g/mL e ET3 100nM todos Sigma) e o meio complexo da CN:  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de SBF, 2% de EE e hormônios e fatores de crescimento [transferrina (10mg/mL), hidrocortisona (0,1mg/mL), glucagon (0,01ng/mL), insulina (1ng/mL), T3 (triiodotironina) (0,4ng/mL), EGF (0,1ng/mL), FGF2 (1ng/mL) (todos Sigma)]. As culturas secundárias foram mantidas por 7 dias (14 dias para os meios osteogênico e adipogênico) a 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. As trocas do meio de cultivo foram realizadas a cada 3 dias sendo a seguir fixadas e submetidas à ensaios de imunofluorescência e de colorações específicas para identificação fenotípica.

#### 4.2.4 Clonagens Celulares

Esses ensaios foram utilizados para avaliar a multipotencialidade das células isoladas de folículo piloso. As culturas clonais foram realizadas como descrito previamente (SIEBER-BLUM *et al.*, 2004), com algumas modificações. Após 14 dias de cultivo utilizando meio  $\alpha$ -MEM acrescido de 15% de SBF suplementado com EGF (20ng/mL) e FGF2 (40ng/mL), os explantes do folículo piloso foram removidos e descartados. As células remanescentes na placa de cultura foram descoladas com solução de tripsina/EDTA e recuperadas após bloqueio com 10% SBF seguido de centrifugação (500 X g por 10 minutos) e submetidas a reação de imunofluorescência, para p75. A seguir, com auxílio de microscópio invertido de fluorescências e micropipeta de vidro, as células foram isoladas com base na expressão do marcador p75 e plaqueadas a uma densidade de 50 células/poço em placas de 35mm (Corning) previamente revestidas com colágeno tipo I (50 $\mu$ g/mL) (Sigma) em meio  $\alpha$ -MEM acrescido de 15% de SBF suplementado com EGF (20ng/mL) e FGF2 (40ng/mL).

### 4.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi analisada pela incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Zymed) como descrito (COSTA-SILVA, 2009), com modificações. As monocamadas celulares foram incubadas por um período de 3 horas com BrdU, e a seguir fixadas com 4% de paraformaldeído durante 30 minutos. As culturas foram lavadas com água destilada e incubadas em 2N de ácido clorídrico, a 50°C por 15 minutos por 2 vezes. Após nova lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo anti-BrdU. A reação de imunocitoquímica para revelação do BrdU foi realizada como descrito no item 4.4., analisadas e documentadas sob microscópio epifluorescente IX71 (Olympus). Os núcleos das células foram corados com 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI). As proporções da expressão do marcador específico (BrdU) foram analisadas pela porcentagem de células marcadas em relação às células totais.

#### 4.3.1 Análise Fenotípica e Imunocitoquímica

Para as análises de expressão protéica as culturas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, enxaguadas três vezes com tampão PBS e os sítios inespecíficos bloqueados com solução de SBF a 5% durante 1 hora. Em seguida, as culturas foram incubadas com anticorpos primários por um período de 1 hora à temperatura ambiente e posteriormente, sob as mesmas condições, com anticorpos secundários conjugados ao fluorocromo *Alexa488* ou *Texas Red*. As células foram novamente enxaguadas com PBS e então incubadas durante com corante DAPI para marcação nuclear. Todas as marcações fluorescentes foram observadas, analisadas e documentadas sob microscópio epifluorescente Olympus IX71. Os anticorpos primários e secundários utilizados são listados na Tabela 1.

Para a identificação de osteócitos e adipócitos foram utilizadas as colorações específicas de vermelho de alizarina e *Oil Red*, respectivamente.

Tabela 1 - Listagem dos anticorpos utilizados nas análises de Imunofluorescência.

Anticorpos	Produzido em	Fenótipo	Diluição	Fabricante
<b>Primários</b>				
Anti-nestina (IgG)	Coelho	CN/célula-tronco	1:250	Abcam
Ant- p75 (IgG)	Coelho	CN/célula-tronco	1:200	Milipore
Anti-P0 (IgG)	Coelho	Célula glial	1:100	Santa Cruz
Anti- $\beta$ -tubulinaIII (IgG1)	Camundongo	Neurônio	1:1000	Promega
Anti-BrdU (IgG1)	Camundongo	Proliferação celular	1:100	Calbiochem
Anti- $\alpha$ -SMA (IgG2a)	Camundongo	Célula Músculo liso	1:800	Sigma
Anti-SMP (IgG1)	Camundongo	Célula glial	1:200	*DSHB
Anti-Tirosina Hidroxilase {TH} (IgG)	Camundongo	Neurônio	1:200	*DSHB
Anti-MelEM (IgG1)	Camundongo	Melanócito	1:200	*DSHB
Anti-TrP2 (IgG)	Camundongo	Melanócito	1:75	Invitrogen
<b>Secundários</b>				
Anti IgG de camundongo Alexa Fluor® 488	Cabra		1:75	Invitrogen
Anti IgG coelho Alexa Fluor® 488	Cabra		1:75	S. Biotech.
Anti IgG1 camundongo Texas Red	Cabra		1:100	S. Biotech.
Anti IgG2a camundongo Texas Red	Cabra		1:100	S. Biotech.

\* *Developmental Studies Hybridoma Bank.*

### 4.3.2 RT-PCR Semiquantitativo

Para realização do RT-PCR, o RNA total foi isolado utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Um mL de Trizol® foi usado para cada 25cm<sup>2</sup> de área da placa de cultura. As amostras foram tratadas com o reagente DNase RQ1 RNase livre (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, para se evitar qualquer contaminação das amostras de RNA com DNA. O RNA foi então quantificado em espectrofotômetro Nanovue (Eppendorf).

Dois microgramas de RNA total foram usados na reação de transcrição reversa, para síntese de cDNA, usando o kit ThermoScript® RT-PCR (Promega), segundo orientações do fabricante. Resumidamente, o RNA total, oligonucleotídeos e água livre de RNases foram adicionados em um microtubo, e as amostras foram submetidas a um ciclo de 70°C por 5 minutos em termociclador, seguidos de 5 minutos de incubação em banho de gelo. Após esta etapa, foram adicionados ao tubo o tampão da enzima, magnésio, dNTPs, RNasin, água e a enzima transcriptase reversa. Na sequência, a solução foi homogeneizada e incubada a 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e finalmente a 70°C por 15 minutos. Ao final da reação, o cDNA foi armazenado a -20°C ou imediatamente utilizado nas reações de PCR.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) utilizando-se 1µL do cDNA proveniente da reação de RT, iniciadores senso e antisenso específicos (Integrated DNA Technologies, Inc) para cada gene analisado (Sox10, Slug, Snail, Pax3, FoxD3 e p75 ) e o kit GoTaq® Green Master Mix (Promega). As reações de amplificação de cDNA foram feitas com 40 ciclos (desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto), com uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos e uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos. A amplificação do housekeeping gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) foi usada como controle interno da reação. Os produtos amplificados nas reações de PCR foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 2%, foram corados com o corante Blue Green (Promega) e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das diferenças foi avaliada por ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para os ensaios de BrdU. A análise da proporção dos clones de células da CN embrionária foi feita por  $\chi^2$ . Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software estatístico GraphPad Prism 4<sup>®</sup>.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 FGF2 INFLUENCIA A POTENCIALIDADE DA CN EMBRIONÁRIA DE CODORNA

Inicialmente investigamos o potencial de diferenciação das células da CN tratadas com FGF2 em culturas em massa. Para isso, culturas primárias foram tratadas com 10ng/mL de FGF2 por 6 dias e 4 dias adicionais em meio complexo para promover a diferenciação celular e então analisadas quanto à expressão fenotípica. Observamos que FGF2 promove um aumento significativo na proporção de células gliais e de neurônios, e simultaneamente promove uma diminuição significativa na proporção de melanócitos e células de músculo liso (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise fenotípica de derivados da CN sob o efeito do FGF2.

<b>Fenótipo</b>	<b>Número de células (%)</b>	
	<b>Controle</b>	<b>FGF2</b>
Glía	<b>15419 (12,06)</b>	<b>42649 *** (27,98)</b>
Melanócitos	<b>11248 *** (8,80)</b>	<b>1239 (0,81)</b>
Músculo Liso	<b>100851 *** (78,91)</b>	<b>78431 (51,46)</b>
Neurônios	<b>183 (0,14)</b>	<b>30043 *** (19,71)</b>
Negativas	<b>99 *** (0,08)</b>	<b>38 (0,03)</b>
Total	<b>127800 (100)</b>	<b>152400 (100)</b>

As culturas da CN foram tratadas durante 6 dias com 10ng/ml de FGF2 e depois mantidas por mais 4 dias em meio complexo para permitir a diferenciação celular. A análise fenotípica de células da CN trunca foi avaliada por imunocitoquímica. Os núcleos totais foram marcados com DAPI. Os valores foram obtidos da análise de 3 experimentos independentes. Os asteriscos representam diferenças significativas dos valores entre controle e FGF2 (\*\*\*)  $P < 0,001$  pela análise da proporção de células foi feita pelo teste de  $\chi^2$ ). A concentração de FGF2 analisada foi de 10ng/mL.

A proporção de células não marcadas para os fenótipos analisados (negativas) foi menor do que 1% em ambas as condições experimentais, porém significativamente maior no

controle. Estes resultados sugerem que FGF2 estimula a diferenciação das células da CN para os fenótipos glial e neuronal a expensas do melanocítico e de músculo liso, porém é necessária a remoção do fator para a diferenciação final.

Em seguida, ainda avaliando a potencialidade das células da CN, realizamos clonagens celulares para avaliar se o FGF2 poderia apresentar efeito instrutivo. Nestes experimentos, células obtidas das culturas primárias foram semeadas individualmente como descrito no item 3.1.3 em Materiais e Métodos, e mantidas na presença de FGF2 por 6 dias sobre substrato de colágeno tipo I.

A seguir o meio contendo FGF2 foi removido e as células cultivadas por mais 4 dias em meio complexo para estimular a diferenciação celular. Neste tipo de experimento, a potencialidade da célula fundadora da colônia (progenitor) é identificada a posteriori pela observação dos tipos celulares presentes. Resultados anteriores, obtidos durante o mestrado, demonstraram que na presença de FGF2 as células da CN permanecem indiferenciadas. Realizamos um total de 718 poços de cultura em cada condição experimental em 15 experimentos. A eficiência clonal foi de 44,4% no controle e 49,7% com o tratamento de FGF2. Foram encontrados clones que apresentavam apenas um único tipo celular dos fenótipos analisados (glia, melanócito ou célula de músculo liso), com exceção do fenótipo neuronal, e clones que apresentavam combinações de 2, 3 ou 4 fenótipos em ambas as condições experimentais), identificando desse modo progenitores mono, bi, tri ou tetrapotentes, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise fenotípica dos precursores da CNT sob o efeito de FGF2

<b>Progenitor</b>	<b>Número de clones (% dos clones)</b>	
	<b>Controle</b>	<b>FGF2</b>
G	4 (1,25)	5 (1,40)
M	<b>**75 (23,51)</b>	49 (13,72)
S	100 (31,34)	120 (33,61)
GM	22 (6,89)	14 (3,92)
GS	58 (18,18)	62 (17,36)
GN	1 (0,31)	0 (0)
MS	19 (5,95)	13 (3,64)
GMS	29 (9,09)	<b>*57 (15,96)</b>
GNS	3 (0,94)	13 (3,64)
GMN	1 (0,31)	3 (0,84)
GMNS	1 (0,31)	<b>*11 (3,08)</b>
U	4 (1,25)	8 (2,24)
Σ (GMS, GNS, GMN, GMNS)	<b>34 (10,36)</b>	<b>84 *** (23,53)</b>
Total	<b>319 (100)</b>	<b>357 (100)</b>

Culturas clonais crescidas sobre substrato de colágeno tipo I e mantidas na ausência (controle) ou presença de 10ng/mL de FGF2 durante 6 dias e mais 4 dias em meio complexo para permitir a diferenciação celular. Os valores foram obtidos de quinze experimentos independentes perfazendo um total de 718 poços de cultura em cada condição. (G) célula glial, (M) melanócito, (S) músculo liso, (N) neurônio e (U) outras. A análise da proporção dos clones foi feita pelo teste de  $\chi^2$ . A concentração de FGF2 analisada foi de 10ng/mL.

O tratamento com FGF2 promoveu um aumento significativo na proporção do progenitor tripotente GMS (15,96%), bem como para o progenitor tetrapotente GMNS (3,08%), em compensação diminuiu a expressão do fenótipo de músculo liso (sendo 23,51% para o controle e 13,72% para o tratado) e do progenitor comprometido com melanócitos, de 23,51 para 13,72% (controle e tratado respectivamente) (Tabela 3).

Em adição a esses resultados, verificamos que a proporção do conjunto de progenitores tri- (GMS, GNS, GMN,) e tetra- (GMNS) potentes, que correspondem aos mais indiferenciados e multipotentes da CN, é significativamente

elevada após o tratamento com FGF2 (Tabela 3). A grande maioria de progenitores deste conjunto (22,69%) apresentou potencialidade dupla para glia e músculo liso, sugerindo fortemente que FGF2 mantenha os progenitores da CN em estado indiferenciado e multipotente.

## 5.2 FGF2 PROMOVE A AUTORRENOVAÇÃO DE PROGENITORES INTERMEDIÁRIOS DA CN EMBRIONÁRIA DE CODORNA

Para avaliar a possibilidade de FGF2 estar promovendo a autorrenovação das células a CN, foram realizados ensaios de subclonagem celulares. Nas condições analisadas, observamos a propagação dos progenitores mono- (G, M e S), bi- (GS, GM, e MS) e tri- (GMS) potentes, por até 4 *rounds* de subclonagens, tanto na situação controle como após o tratamento com FGF2. Nas culturas controle, a partir da 3ª subclonagem foram observados apenas progenitores monopotentes, sendo que na 4ª subclonagem, 100% dos progenitores estavam comprometidos com o fenótipo de músculo liso (Tabela 4). No entanto, nas culturas tratadas com FGF2, o progenitor bipotente GS foi observado até a 4ª subclonagem, quando ainda observamos progenitores monopotentes para células gliais e musculares lisas, sugerindo que o tratamento com FGF2 direciona a potencialidade das células da CN para o fenótipo glial a expensas do muscular liso, além de promover a propagação do progenitor GS por várias gerações.

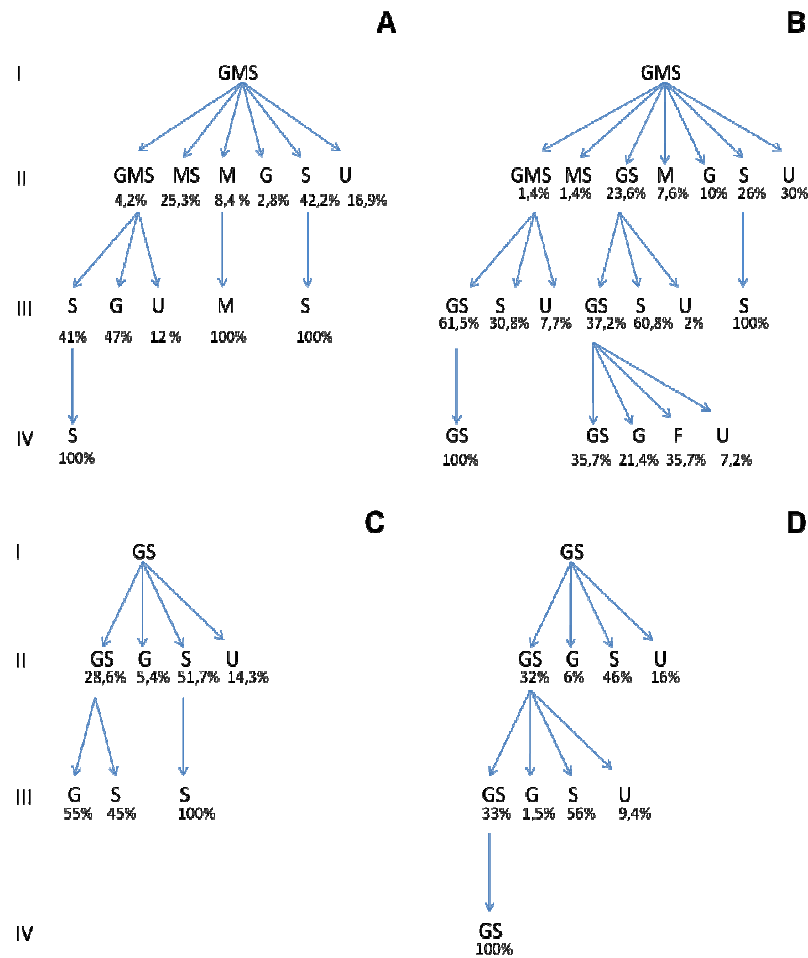
Tabela 4 - Propagação dos precursores da CN.

	% do total dos clones							
	Controle				FGF2			
<b>Progenitor</b>	I	II	III	IV	I	II	III	IV
G		2	12.2			8.4	4	20
M	13	32	9		3.3	9	3.3	
S	18	43.6	75.5	100	12.8	38.8	65.5	33.3
GS	15	15.7			21.8	23.8	32.4	43.3
GM	4.3				1			
MS	7.4	5			0.5	1.5		
GMS	14	1.5			18.4	0.7		

Os tipos de progenitores derivados da CNT através de subclonagens foram analisadas e quantificadas (% do total de clones) em clonagens sucessivas I-IV. Os valores foram obtidos de quinze experimentos independentes. O total do número de clones são os seguintes: 162, 204, 98 e 65 para o controle I-IV respectivamente, e 179, 273, 148 e 30 para FGF2 I-IV respectivamente.

A análise da propagação dos precursores GMS e GS são resumidos na Figura 7. Os resultados demonstram que o progenitor tripotente GMS se renovou somente até a primeira subclonagem (I) e originou clones GS e MS tanto na condição controle quanto após o tratamento com FGF2. Os progenitores GM e MS também foram subclonados (dados não mostrados), porém não tiveram propagação além da 1ª subclonagem. No entanto, na presença de FGF2 o progenitor GS foi capaz de se propagar até a 4ª geração, mantendo a capacidade de originar também células gliais e de músculo liso. Nestes ensaios de subclonagens pudemos demonstrar que o precursor GS se autorrenova *in vitro* mantendo a multipotencialidade, características de célula-tronco. Este experimento sugere que o FGF2 renova os progenitores bipotentes (GS) que posteriormente irão diferenciar para os fenótipos glial e de músculo liso.

Figura 7 - Autorrenovação das células da CN



Fonte: Próprio autor.

Clones primários (I) obtidos de células fundadoras **GMS** e **GS** foram subclonados sequencialmente e mantidos na condição controle (**A** e **C**) ou submetidos ao tratamento com **FGF2** (**B** e **D**). Em cada geração, diferentes tipos de clones foram produzidos pela autorrenovação de células fundadoras e são indicadas em porcentagem. Clones subclonados a partir da célula **GMS** renovaram 1X (I-II) (**B**) e clones **GS**

se renovam 3X (I –IV). (D) Células glias (G), Melanócito (M), Células de músculo liso (S) e outras (U).

### 5.3 O FOLÍCULO PILOSO DE CAMUNDONGO É UM POTENCIAL NICHOS DE CÉLULAS-TRONCO DA CN

Inicialmente aperfeiçoamos as condições de cultura de células de folículo piloso de camundongo, identificando protocolos mais eficientes de obtenção e cultivo dessas células. Para isso utilizamos a técnica de SIEBER-BLUM et al., 2004, com algumas adaptações onde obtivemos uma melhor adesão do bulge e migração das células.

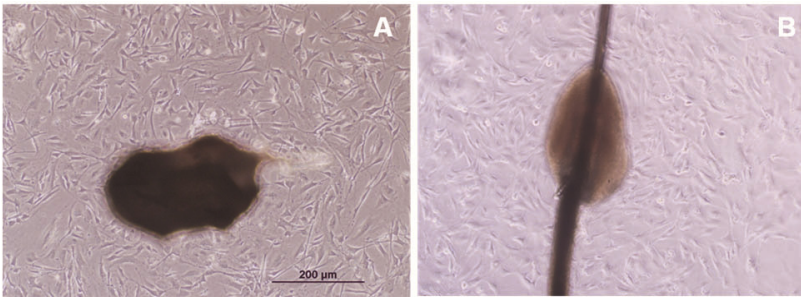
Efetuamos experimentos mantendo ou não a haste do pelo. A utilização somente do bulge sem a haste do pelo mostrou-se mais eficiente do que quando realizamos as culturas na presença desta.

A migração das células para a placa de cultura foi mais rápida e pronunciada, fornecendo quantidade de células suficiente para a realização dos experimentos subsequentes. As células obtidas desta maneira apresentaram morfologia alongada e fusiforme, semelhante às células da CN embrionária (Figura 8). Outra variação da metodologia utilizada foi a tripsinização das células do bulge e posterior plaqueamento.

Utilizamos tripsina a 0,05% por 15 minutos e a mistura de dispase (BD) e tripsina 0,05% (1:1) por 30 minutos. Esta metodologia não apresentou resultado satisfatório, pois as células não dissociaram adequadamente comprometendo a realização das culturas. Além disso, testamos diferentes meios de cultivo. Utilizamos meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com diferentes concentrações de SBF (10%, 15% e 20%) e EE (2%, 4% e 6%), além do meio complexo.

Não houve variações significativas quanto à migração celular, por isso padronizamos como meio de cultivo  $\alpha$ -MEM a 85% e SBF a 15%. Uma observação importante foi em relação ao volume do meio de cultura nas 16 horas iniciais (600 $\mu$ L), sendo este crucial para a adesão do folículo piloso (bulge) a placa. A padronização da metodologia proporcionou uma maior taxa de aderência e em consequência maior quantidade de células para a realização dos experimentos posteriores.

Figura 8 - Migração e adesão das células do folículo piloso (*bulge*).



Fonte: Próprio autor.

(A) Fotografia representativa em microscópio de contraste de fase de células migratórias do folículo piloso sem a haste do pelo e (B) com a haste do pelo. Aumento de 400x.

Para investigar a multipotencialidade das células do bulge (folículo piloso), caracterizamos as culturas celulares por dois métodos: RT-PCR e imunofluorescência para a presença de marcadores de CN e marcadores de tipos celulares diferenciados. As análises de expressão gênica por RT-PCR (Figura 9) revelaram que essas células expressam o RNAm dos fatores de transcrição Pax3, Slug, Snail, Sox10 e do receptor p75, característicos das populações mais indiferenciadas de células da CN (MEULEMANS & BRONNER-FRASER, 2004). A expressão de FoxD3, um marcador específico de algumas populações de células da CN, não foi detectada. Estes experimentos confirmam os trabalhos de SIEBER-BLUM et al., 2004 que sugere que o folículo piloso mantém no animal adulto uma população de células-tronco da CN e demonstram que células semelhantes à CN estão presentes em nossas condições de cultivo.



Figura 9 - Análise de expressão gênica em células do folículo piloso (bulge)

Fonte: Próprio autor.

RT-PCR de genes envolvidos na determinação e migração das células da CN embrionárias revelou que as células do folículo piloso de 14 dias de cultura primária expressam os fatores de transcrição Pax3, Slug, Snail e Sox10 e p75. A expressão de FoxD3 não foi detectada. Como controle positivo das reações utilizou-se RNA obtido de tubo neural de embrião E12.

Em adição, analisamos por imunofluorescência a expressão proteica de nestina e p75, também marcadores de

células indiferenciadas da CN (STEMPLE & ANDERSON, 1992). Nestina é considerado ainda marcador de células-tronco/progenitoras neurais (LEND AHL *et al.*, 1990; FERNANDES *et al.*, 2004). As análises revelaram que aproximadamente 95% das células derivadas do folículo piloso expressam nestina e 15% expressam p75 em culturas primárias (Figura 10). Estes dados sugerem que as células do folículo piloso (*bulge*) mantêm a expressão dos marcadores indiferenciados da CN após migração inicial.

Figura 10 - Fotografias representativas de imunofluorescência para nestina e p75 em células do folículo piloso.

Fonte: Próprio autor.

Fotomicrografia de fluorescência das células imunomarcadas para nestina (A) e p75 (C) (marcadores de células indiferenciadas) em culturas de folículo piloso de 14 dias. (B) e (D) marcação de núcleo com DAPI. Aumento de 400x.

#### 5.4 FGF2 E EGF INFLUENCIAM A PROLIFERAÇÃO E O POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DO FOLÍCULO PILOSO DE CAMUNDONGO

Os fatores de crescimento FGF2 e o EGF são capazes de estimular a proliferação e a manutenção da plasticidade celular de células-tronco neurais (TOMA *et al.*, 2005), representando assim uma alternativa para a expansão *in vitro* dos progenitores mais indiferenciados de células oriundas do folículo piloso. Para realizarmos essas análises, após 14 dias de cultura primária, os explantes foram removidos e as células remanescentes tripsinizadas e subcultivadas a uma densidade de 50 células/poço em placas de 96 poços revestidas com colágeno tipo I. As culturas foram mantidas por 7 dias na presença ou não de FGF2 (40ng/mL) e EGF (20ng/mL) e submetidas aos ensaios de proliferação celular, RT-PCR e imunofluorescência.

Ensaio de incorporação de BrdU revelaram um aumento significativo na proliferação celular nas culturas mantidas na presença dos dois fatores de crescimento quando comparado a condição controle (Figura 11 - Ensaio de proliferação celular nas culturas secundárias do folículo piloso através de incorporação de BrdU).

). A taxa de proliferação celular nas células cultivadas na presença de FGF2/EGF (8,5%) é cerca de duas vezes superior à observada na condição controle (4,3%).

Figura 11 - Ensaio de proliferação celular nas culturas secundárias do folículo piloso através de incorporação de BrdU.

Fonte: Próprio autor.

Núcleos marcados em verde correspondem às células BrdU positivas (em processo de divisão celular) enquanto os núcleos totais foram corados com DAPI, em azul. Aumento de 400x. Os resultados são expressos como proporção de células BrdU positivas em relação ao número total de células. Os valores representam as médias  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes feitos em triplicata. \*  $p < 0,05$  por teste t.

Para verificar o estado de diferenciação celular após o tratamento com FGF2 e EGF, analisamos a expressão de fatores de transcrição cuja expressão reflete o estado indiferenciado e multipotente das células da CN embrionária. O ensaio de RT-PCR (Figura 12) demonstrou o mesmo padrão de expressão gênica obtido nas culturas primárias que são característicos das populações mais indiferenciadas de células da CN.

Estes dados demonstram que o tratamento simultâneo de FGF2 e EGF é capaz de promover uma maior taxa de proliferação celular e manter a expressão dos fatores de transcrição associados ao estado indiferenciado e multipotente Pax3, Slug, Snail e Sox10, podendo ser uma alternativa para a expansão dessas células.

Embora os resultados sejam semelhantes para ambas as culturas (controle e tratado), estes dados sugerem que os fatores

FGF2 e EGF podem promover um aumento da população de células semelhantes à CN do *bulge* e possivelmente manter em estado indiferenciado por longos períodos, semelhante à CN embrionária.

Figura 12 - Análises de expressão gênica por RT-PCR em culturas secundárias do folículo piloso.

Fonte: Próprio autor.

As células expandidas em FGF2 e EGF mantêm a expressão dos fatores de transcrição envolvidos na determinação e migração das células embrionárias da CN Pax3, Slug e Snail e Sox10. Como controle positivo das reações utilizou-se RNA obtido de tubo neural de embrião E12

A seguir investigamos o efeito de FGF2 e EGF na diferenciação das células provenientes do bulge. Para tanto, após 14 dias de cultura primária em meio controle, realizamos culturas secundárias tratadas com 40ng de FGF2 e 20ng de EGF ou na ausência dos fatores. Marcadores dos derivados da CN (glia, melanócitos, miofibroblastos e neurônios) foram avaliados por imunofluorescência, sendo estes: CN (nestina), células de

músculo liso ( $\alpha$ -SMA), melanócitos (MelEM), células neuronais ( $\beta$ -tubIII) e células gliais (P0). A presença de células positivas para P0 e para MelEM não foi detectada nestas culturas (Figura 13).

Figura 13 - Fotografias representativas de imunofluorescência em células do folículo subcultivadas na presença dos fatores de crescimento FGF2 e EGF.

Fonte: Próprio autor.

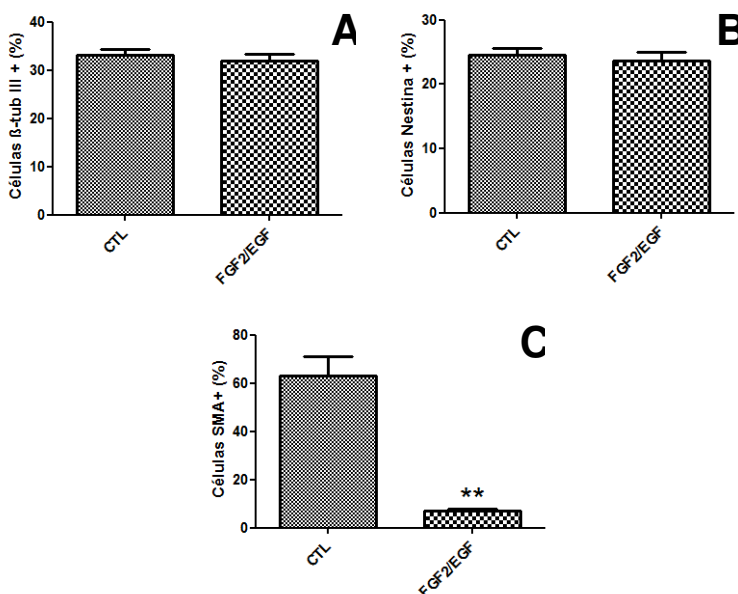
Fotomicrografia de fluorescência das células do folículo piloso em culturas secundárias imunomarcadas para nestina (marcador de células indiferenciadas),  $\beta$ -tubIII e  $\alpha$ -SMA (marcadores característicos de

células neuronais e de músculo liso respectivamente). (B), (D) e (F) FGF2 e EGF e (A), (C) e (E) para o controle. Aumento de 400x.

Os ensaios de imunofluorescência demonstraram qualitativamente que as células do folículo piloso exibem morfologia alongada e com grandes prolongamentos nas culturas tratadas com FGF2/EGF em contraste a condição controle tanto para o marcador de células indiferenciadas, nestina, quanto para o marcador de células neuronais,  $\beta$ -tubIII. Em adição, o tratamento de FGF2/EGF resultou em mudanças morfológicas onde as células tornaram-se mais alongadas e filamentosas. Estes resultados mostram um possível direcionamento das células do folículo piloso na diferenciação neuronal sob o efeito de FGF2/EGF.

A partir destes dados foi realizada a quantificação dos fenótipos mencionados anteriormente (expressão de nestina, marcador de células de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e células neuronais ( $\beta$ -tubIII) (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do FGF2 e EGF na expressão de células do folículo piloso (*bulge*).



Fonte: Próprio autor.

O gráfico representa a proporção de células do folículo piloso sob o efeito do FGF2 e EGF quantificado a partir das imagens microscópicas (A-C). (A) nestina (marcador de células indiferenciadas), e (B e C)  $\beta$ -tubIII e  $\alpha$ -SMA (proteínas neuronais e de músculo liso respectivamente). Os resultados são expressos como número total de células em relação ao controle de 3 experimentos individuais. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas dos valores com relação ao controle (\*\*  $p < 0,01$  por ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey). Barra = 20 $\mu$ m.

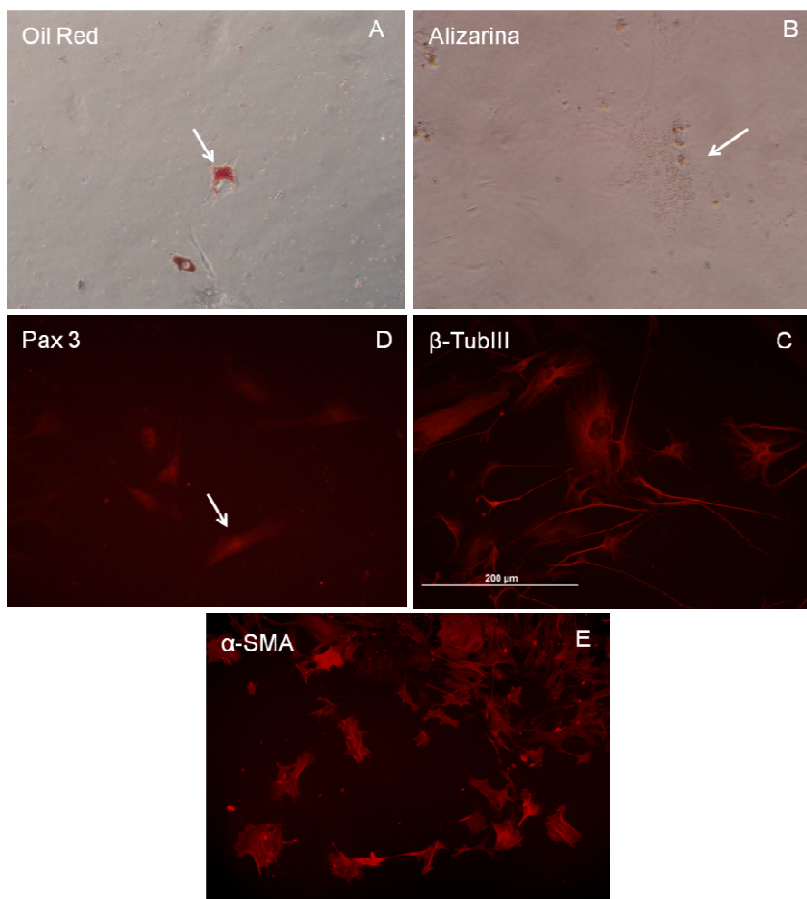
Os resultados demonstraram proporção similar de células positivas para nestina e para  $\beta$ -tubIII entre as culturas mantidas com FGF2/EGF e controle (Figura 14A e Figura 14B). Em contrapartida observamos uma diminuição de 9 vezes no número de células marcadas para  $\alpha$ -SMA (Figura 13C). Estes resultados sugerem os fatores FGF2 e EGF reduzem a diferenciação muscular lisa nas células de folículo piloso.

SIEBER-BLUM e colaboradores (2004) demonstraram que as células com características da CN em folículo piloso de vibrissas de camundongos quando submetidas a análises clonais in vitro, dão origem a progenitores com potencial para neurônios, células gliais, células do músculo liso, melanócitos e condrócitos. Para analisar um possível efeito de EGF e FGF2 no potencial de diferenciação dessas células semelhantes à CN de folículo piloso, culturas em massa de células foram tratadas com FGF2/EGF durante 14 dias de cultura primária, e a seguir as células foram tripsinizadas e plaqueadas em meios específicos de diferenciação: neural, glial, adipogênica, osteogênica, melanocítica, meio complexo da CN e no próprio meio de tratamento FGF2/EGF. Após 7 dias, as células foram fixadas e analisadas por ensaios de imunofluorescência e de colorações específicas para identificação fenotípica dos marcadores celulares derivados da CN, sendo adipócito (oil red), osteócito (alizarina), melanócito (Pax 3), células neuronais ( $\beta$ -tubIII) e células de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (Figura 15).

Os resultados demonstraram que as células do folículo tratadas com FGF2 e EGF durante fase de migração do folículo piloso, apresentam potencial de diferenciação para fenótipos mesodermiais (adipogênico, osteogênico, muscular liso) e expressam marcadores melanocíticos e neural.



Figura 15 - Fotografias representativas de imunofluorescência para células do folículo piloso.



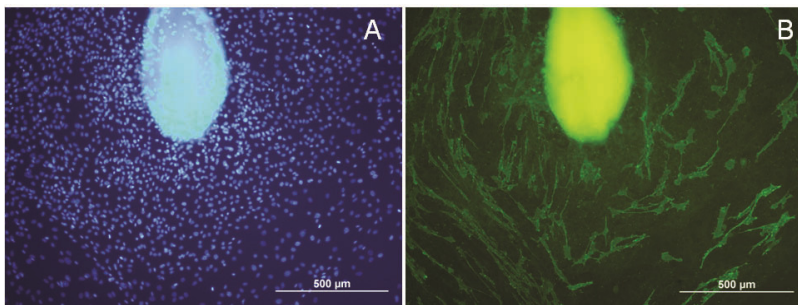
Fonte: Próprio autor.

Imagens microscópicas mostrando adipócitos (A - Oil Red), osteócitos (B – Alizarina), melanócitos (C – Pax 3), células neuronais (D –  $\beta$ -TubIII) e de músculo liso (E –  $\alpha$ -SMA) em culturas secundárias tratadas previamente (cultura primária) com FGF2/EGF. Aumento de 200x.

A seguir, investigamos se o tratamento com FGF2 e EGF influencia a proliferação e potencialidade da população de células características da CN. Para tanto, investigamos as

células positivas para p75, considerado um importante marcador de CN (Figura 16 e Figura 17 e Tabela 5).

Figura 16 - Fotografias representativas de imunofluorescência para p75 em células do foliculo piloso.

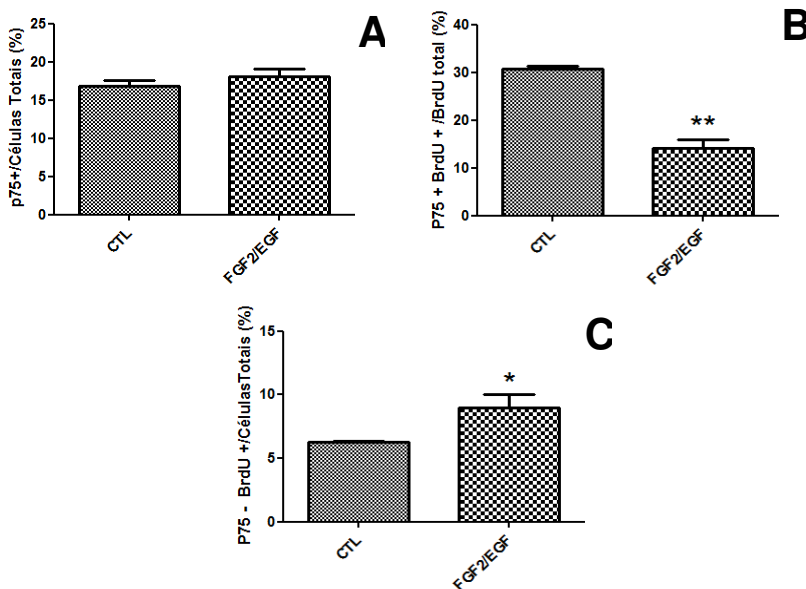


Fonte: Próprio autor.

Imagens microscópicas mostrando a marcação de p75 de células migratórias do bulge em culturas primárias de 14 dias. (A) marcação de núcleo com DAPI e (B) marcação para p75. Aumento de 200x.

Para avaliar um possível efeito dos fatores de crescimento na proliferação das células positivas para p75, realizamos análises de imunofluorescência para p75 e BrdU em culturas secundárias após 7 dias de tratamento com FGF2/EGF (Figura 17). Analisando a proporção de células marcadas com p75, não observamos diferenças entre o grupo controle o tratado com FGF2/EGF (Figura 17A). No entanto, o tratamento com esses fatores de crescimento promoveu uma diminuição significativa (2,17 vezes) na proporção de células duplamente positivas para p75 e BrdU (Figura 16B), acompanhado de aumento significativo (1,42 vezes) na proporção de células negativas p75 e positivas para BrdU (Figura 17C). Em conjunto esses resultados sugerem que FGF2/EGF apresenta efeitos diferentes nas populações de células positivas quanto negativas para p75, reduzindo ou estimulando, respectivamente, a proliferação celular.

Figura 17 - Efeito do FGF2 e EGF na expressão de células positivas para p75 do folículo piloso (*bulge*) em culturas secundárias.



Fonte: Próprio autor.

O gráfico representa a proporção de células do folículo piloso sob o efeito do FGF2 e EGF quantificado a partir das imagens microscópicas (A-C). (A) p75 (marcador de células indiferenciadas da CN) e (B) BrdU (proliferação celular). Os resultados são expressos como número total de células em relação ao controle de 3 experimentos individuais. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas dos valores com relação ao controle (\*\*  $p < 0,01$  por ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey). Barra = 20 $\mu$ m

Estes resultados levantaram a questão sobre o efeito de EGF e FGF2 na potencialidade das células positivas para p75. Para investigar esse ponto, realizamos ensaios de clonagem celular como descrito em Materiais e Métodos item 4.2.3.

Foram identificados 2 tipos de clones: clones contendo apenas células positivas para  $\alpha$ -SMA e clones contendo apenas células positivas para  $\beta$ -tubIII (Tabela 5). Não encontramos clones com células marcadas para nestina. Os resultados demonstraram uma eficiência clonal de 6% para células positivas

para p75 e 5,33% para células negativas para esse marcador. Não foram observadas diferenças significativas na potencialidade das células positivas e negativas para p75 com relação ao marcador neuronal e muscular liso.

Tabela 5 - Análise clonal das culturas do folículo piloso com relação à expressão de p75.

<b>Marcador</b>	<b>Número de clones (%)</b>	
	<b>P75 -</b>	<b>P75 +</b>
$\beta$ -tubIII+	<b>9 (50)</b>	<b>7 (43,75)</b>
$\alpha$ -SMA+	<b>8 (44,44)</b>	<b>8 (50)</b>
Outros	<b>1 (5,56)</b>	<b>1 (6,2)</b>
Total de clones	<b>18 (100)</b>	<b>16 (100)</b>

As culturas primárias e secundárias foram mantidas sob o tratamento de FGF2/EGF durante 14 e 7 dias (respectivamente). As clonagens foram realizadas de acordo com a expressão ou não de p75. A análise fenotípica para marcadores de células da CN foi avaliada por imunocitoquímica. A porcentagem dos tipos de clone foi realizada em relação ao número total de clones. Os valores foram obtidos da análise de 3 experimentos independentes em triplicata (totalizando 300 células em cada condição experimental). A análise estatística foi feita pelo teste de  $\chi^2$ .



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 FGF2 INFLUENCIA A DIFERENCIAÇÃO, POTENCIALIDADE E RENOVAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN EMBRIONÁRIA DE CODORNAS

Em trabalhos anteriores, realizados durante o mestrado, demonstramos que as células da CN permanecem em estado indiferenciado na presença de FGF2, havendo necessidade de substituir o fator pelo meio complexo para promover a diferenciação celular (BITTENCOURT, 2007). No presente estudo, utilizando o mesmo protocolo de cultura, demonstramos que o tratamento prévio com FGF2 estimula as células da CN a se diferenciarem para os fenótipos glial e neuronal às expensas dos fenótipos melanocítico e muscular liso. Estes resultados podem ser comparados aos trabalhos de Palmer e colaboradores (1999) que demonstraram que o fator FGF2 pode ativar ambos os programas de diferenciação glial e neuronal nestas células, sugerindo que concentrações específicas deste fator de crescimento podem promover um aumento de um precursor comum para células gliais e neurônios.

O FGF2 é conhecido pelos seus efeitos em progenitores neuronais do sistema nervoso central (MCKINNON *et al.*, 1990) e vários experimentos têm demonstrado que é um mitógeno importante para a manutenção de proliferação dessas células multipotentes *in vitro* (GRITTI *et al.*, 1996; TROPEPE *et al.*, 1999). Em nosso trabalho, observamos que o direcionamento fenotípico dos progenitores da CN é influenciado por FGF2. Os efeitos do FGF2 na CN embrionária de codorna foram investigados avaliando a potencialidade e autorrenovação, através de clonagens e subclonagens celulares.

Este modelo animal foi utilizado uma vez que trabalhos recentes no laboratório utilizando embriões de aves e mamíferos revelaram um comportamento muito parecido da CN murina e de codorna em análises do efeito da MEC na proliferação e diferenciação das células da CN (COSTA-SILVA *et al.*, 2009). Além disso, a complexidade dos ensaios de clonagens celulares e a necessidade de um número grande de embriões inviabilizaram os experimentos em modelos murino. O fator de crescimento estimulou um aumento significativo do conjunto de

progenitores tri e tetrapotentes que representam os mais indiferenciados e multipotentes da CN.

A grande maioria deste grupo apresenta potencialidade dupla para glia e células de músculo liso. Observamos que os neurônios presentes nestes clones apresentaram a característica de formar aglomerados (*clusters*) neuronais. Estes dados estão de acordo com os nossos resultados de cultura de massa e sugerem que as células mais indiferenciadas da CN podem ser influenciadas pelo FGF2 direcionando-as para as linhagens neurais, que corroboram com achados anteriores que sugerem que o FGF2 pode estar envolvido na diferenciação dos progenitores da CN para o fenótipo glial em ambos os modelos de aves e mamíferos (GARCEZ *et al.*, 2009; OTA & ITO, 2006).

Em contrapartida, recente estudo realizado em nosso laboratório por Bianca Luise Teixeira durante a sua dissertação de mestrado e ainda não publicado, mostrou que o fator de crescimento EGF não foi capaz de estimular o aumento dos progenitores mais indiferenciados da CN como mostrado pelo FGF2, no entanto promove a diferenciação terminal de melanócitos e neurônios (comunicação pessoal). Estes dados sugerem que os fatores de crescimento, como o FGF2, EGF ou Shh, possuem funções distintas em estágios específicos de desenvolvimento da CN.

A CNT é composta de progenitores dotados de potencialidades diferentes, incluindo o progenitor GMNS (TRENTIN *et al.*, 2004). Nossos resultados clonais sugerem que FGF2 possa estar estimulando e direcionando o progenitor GMNS para o fenótipo glial e neuronal, visto que a proporção deste progenitor tetrapotente foi significativamente elevada após o tratamento.

Os resultados de diferenciação celular obtidos nas culturas em massa corroboram com esse achado, pois a proporção de células gliais e neuronais foi aumentada. Verificamos ainda que FGF2 promoveu aumento significativo na frequência dos progenitores GNMS e GMS, e diminuição da frequência do progenitor M. Trabalhos clonais similares demonstraram que o fator Shh aumenta a frequência de progenitores multipotentes da CN, com potencial neural-mesenchimal a expensas do potencial apenas neural (CALLONI *et al.*, 2007; CALLONI *et al.*, 2009).

Nossos resultados foram os primeiros a investigar o papel do fator FGF2 na autorrenovação dos progenitores da CN

embrionária Os ensaios de subclonagem mostraram que o precursor GS, e possivelmente GMS, se autorrenova após tratamento com FGF2, se comportando assim como célula-tronco (Figura 1). Estes resultados diferem dos encontrados por Trentin e colaboradores (2004), que mostraram que o progenitor GM foi capaz de se autorrenovar por várias gerações sob estímulo de ET3, enquanto que o GS não dependia deste fator para isso. Limitações dos ensaios clonais não nos permitiram avaliar a capacidade de autorrenovação dos progenitores multipotentes que estão no topo da hierarquia da linhagem da CN (como o progenitor GMNS) são capazes de se autorrenovar.

Em resumo, os nossos resultados relacionados à CN embrionária, mostraram que o FGF2 estimula a renovação e proliferação dos precursores mais indiferenciados e multipotentes da CNT mantendo-os indiferenciados. FGF2 estimula a autorrenovação do precursor bipotente GS, ao mesmo tempo em que estimula programas de diferenciação celular para as linhagens glial e neuronal em detrimento da diferenciação melanocítica. No entanto, a diferenciação terminal só ocorre após a remoção de FGF2.

## 6.2 CN PÓS-MIGRATÓRIA DE FOLÍCULO PILOSO MURINO: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO.

A descoberta na pele, e em particular no folículo piloso, de células-tronco com características de CN foi um dos resultados mais surpreendentes dos últimos anos no campo da CN. Em 2001, o grupo de FREDA MILLER isolou da pele de roedores, células multipotentes. Devido o seu potencial de diferenciação, sugere-se que estas células, chamadas de células precursoras da pele humana (SKPs), têm sua origem na CN, uma vez que podem gerar neurônios, células gliais e de músculo liso, além de adipócitos (TOMA et al., 2001).

Em outra publicação, o mesmo grupo demonstrou que as SKPs possuem propriedades semelhantes às células da CN embrionária (FERNANDES et al., 2004). Pesquisas mais recente têm demonstrado que o folículo piloso contém um repertório relativamente amplo de populações de células-tronco adultas, incluindo aquelas envolvidas na homeostase de toda a epiderme, das glândulas sebáceas e da própria estrutura do folículo



(LAVKER & SUN, 2000; TAYLOR *et al.*, 2000) e células-tronco de origem da CN (FERNANDES *et al.*, 2004; SIERBER-BLUM *et al.*, 2004, TOMA *et al.*, 2005; WONG *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2010).

A investigação da biologia celular do folículo piloso (*bulge*) e o seu uso em aplicações clínicas, como na medicina regenerativa e terapia genética, requerem o isolamento de células vivas e identificação de marcadores específicos que permita o isolamento mais preciso (OHYAMA, 2007).

Com base nestas informações, estudamos neste trabalho, protocolos de obtenção e cultivo de células semelhantes à CN de folículo piloso. Avaliamos diferentes metodologias e vários meios de cultivo, e aperfeiçoamos método de extração destas células para realização dos ensaios investigativos subsequentes.

A metodologia que permitiu maior aderência do explante na placa de cultura e melhor migração celular foi a utilização da região do *bulge* desprovido da haste do pelo, e cultivo em meio  $\alpha$ MEM a 85% e SBF a 15%, uma adaptação da metodologia de PEREIRA (2011).

A partir deste protocolo identificamos nestas culturas a presença de marcadores específicos da CN através de RT-PCR e imunofluorescência. Demonstramos que células isoladas do *bulge* de vibrissas de camundongos adultos podem ser caracterizadas pela expressão dos fatores de transcrição *Pax3*, *Slug*, *Snail*, *Sox10* e *p75*, todos envolvidos em processos de migração e determinação de células embrionárias da CN.

Nossos resultados demonstram que essas células expressam também os marcadores protéicos p75, conforme já descrito (SIEBER-BLUM *et al.*, 2004), e o marcador nestina. Estes achados estão em concordância com os resultados de PEREIRA (2011) que verificou que as células do folículo piloso foram positivas para p75 e nestina. Entretanto, células positivas para p75 foram encontradas somente nas culturas mais longas de 14 dias, sugerindo que as células semelhantes à CN são características de estágios mais tardios da cultura.

Trabalhos de investigação do folículo piloso realizados por AMOH *et al.*, (2008) demonstraram que nestina, considerado um marcador de células progenitoras neurais, é também expresso em células-tronco no folículo piloso, sugerindo que existam células-tronco multipotentes para neurônios bem como para outros tipos celulares nesta estrutura. Este resultado é

semelhante aos nossos achados. Em adição, PEREIRA (2011) demonstrou que as células do folículo piloso positivas para citoqueratina14 (KRT14) (marcador de queratinócitos) apresentam morfologia diferente das células marcadas para nestina e p75, sugerindo que diferentes populações celulares migram do explante do folículo piloso.

Em resumo, estes dados sugerem que o folículo piloso de animais adultos possui populações distintas de células-tronco. Além disso, células derivadas do *bulge* podem manter características de tecidos embrionários como a CN, como demonstrado pelo padrão de expressão gênica e protéica.

A expansão *in vitro* de células-tronco adultas constitui uma etapa fundamental para o desenvolvimento de terapias futuras. Um enorme esforço tem sido efetuado no sentido de definir as condições de cultivo ideais para a expansão de várias populações de células-tronco.

Tais condições devem promover o aumento no número de células, evitarem a perda da capacidade de autorrenovação e manter as células indiferenciadas (ULLOA-MONTOYA et al., 2005). Outro aspecto bastante investigado tem sido a influência de fatores de crescimento. Muitos desses fatores são capazes de inibir a apoptose, induzir a proliferação celular e até mesmo proporcionar ou prevenir a diferenciação celular. Além disso, podem ser utilizados na obtenção de uma linhagem celular de interesse a partir de células-tronco multipotentes. Com o intuito de aperfeiçoar um protocolo de cultivo que permita a expansão de células com características da CN, optamos por analisar, os efeitos dos fatores de crescimento FGF2 e EGF nas células do folículo piloso, uma vez são capazes de estimular a proliferação e a manutenção da plasticidade celular, bem como modular a diferenciação de diversos tipos celulares incluindo SKPs e células-tronco neurais (FERNANDES et al., 2004; OTA & ITO, 2006; LIN et al., 2009).

No cultivo de células-tronco mesenquimais adultas, resultados obtidos por JEREMIAS (2009) sugerem que o FGF2 mantenha tais células em estado indiferenciado e de alta proliferação, enquanto o EGF pode comprometê-las com um fenótipo neural, embora ainda indiferenciadas. Em adição, trabalhos de investigação em células da polpa dental humano realizado por DUARTE (2010) mostraram que estas se mantêm em um estado neural mais indiferenciado, sugerindo que os

fatores FGF2 e EGF podem modular populações de células-tronco neurais em animais adultos mantendo-as em um estado multipotente. Além disso, Toma e colaboradores (2005) demonstraram que as SKPs podem proliferar em resposta ao FGF2 e EGF. Esta população de células-tronco expressa marcadores como nestina, fibronectina e vimentina, podendo ser mantida com os dois fatores por longos períodos de tempos e ainda com o potencial de diferenciar em neurônios, células gliais e de músculo liso. A presença dos fatores FGF2 e EGF são indispensáveis para a obtenção e manutenção, sem perda de potencialidade, de SKPs por até um ano.

No presente trabalho, demonstramos que o tratamento simultâneo com FGF2 e EGF é capaz de promover uma maior taxa de proliferação celular nas células do folículo piloso e manter a expressão dos fatores de transcrição associados ao estado indiferenciado e multipotente da CN *Pax3*, *Slug*, *Snail* e *Sox10*, podendo ser uma alternativa relativamente simples para a expansão dessas células. Nossos resultados com a CN embrionária sugerem ainda que o FGF2 e o EGF podem ser úteis na obtenção de uma linhagem neuronal a partir da população de células isoladas do folículo piloso adulto. A expressão de nestina e  $\beta$ -tubulinaIII, como a observada em nossos experimentos, tem sido amplamente utilizada na caracterização de diversos precursores comprometidos com a linhagem neuronal (KANEMURA *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2007). Em ensaios de massa com o tratamento simultâneo dos fatores FGF2/EGF, as células do folículo piloso diferenciam para fenótipos adipogênico, osteogênico, melanocítico, células neuronais e de músculo liso em condições específicas o que sugere que estas células mantêm o potencial para estes fenótipos mesmo em condições prolongadas de cultura. Estes dados podem ser úteis alternativas de expansão destas células, promovendo a proliferação e manutenção das células semelhantes à CN.

O marcador p75 é considerado um marcador de células migratórias e indiferenciadas da CN embrionária (ANDERSON, 1989). Sendo uma proteína membrana, podem ser realizados experimentos com as células vivas (LEE *et al.*, 2007). Em nosso trabalho analisamos o potencial de diferenciação das células do folículo piloso pela expressão de p75. Primeiramente verificamos através de ensaios de proliferação o efeito do tratamento de

FGF2/EGF em células que expressavam ou não esse marcador. As análises demonstraram que não houve diferenças significativas de proliferação de células positivas para p75 em relação ao controle, mas obtivemos um aumento significativo na proliferação de células negativas para p75. Estes resultados sugerem que FGF2/EGF tenha efeitos diferentes nas populações de células presentes no folículo piloso, seja estimulando ou reduzindo a proliferação celular.

LI e colaboradores (2007) demonstraram que subpopulações de explantes oriundos de gânglios da raiz dorsal de ratos adultos expressam *in vitro* marcadores nestina e p75, progenitores da CN e possuem a característica de multipotencialidade e habilidade de autorrenovação de células da CN. Em adição aos resultados anteriores, analisamos o potencial de diferenciação de células do folículo piloso que expressam o marcador p75 através de ensaios clonais. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas em clones que expressavam o marcador p75 daquelas que não expressavam. Estes dados sugerem que existem duas populações de células oriundas do folículo piloso (p75+ e p75-) que possuem potencialidade semelhante às células da CN.

Assim como as células da CN, células do folículo piloso que possuem característica de CN possuem inato grau elevado de plasticidade. Estas células podem dar origem a toda a matriz de células da CN, incluindo neurônios cranianos, células de Schwann, células do músculo liso, condrócitos, melanócitos, e, possivelmente, outros tipos de células que se originam a partir da CN cranial (SIEBER-BLUM *et al.*, 2004). Em adição, células do folículo piloso são abundantes e possuem elevado grau de plasticidade, são facilmente acessíveis e podem ser adquiridas através de cirurgia minimamente invasiva em transplantes autólogos.



## 7 DISCUSSÃO GERAL

Estudos de investigação da multipotencialidade e plasticidade da CN confirmaram seu potencial de células-tronco e está bem estabelecido que o microambiente apresenta um importante papel no direcionamento destas células tanto nas fases embrionária quanto pós-migratória. Embora as células da CN tenham sido amplamente investigadas, a ação dos fatores FGF2 e EGF na sua potencialidade ainda têm sido pouco compreendida (SHERMAN et al., 1993; SARKAR et al., 2001; ABZHANOV et al., 2003).

Atualmente, a combinação de EGF e FGF2 é amplamente utilizada nos processos de isolamento de progenitores e células tronco de vários tecidos neurais (ALVAREZ-BUYLLA & GARCIA-VERDUGO, 2002; MCKINNON et al., 1990) e não-neurais incluindo medula óssea, derme e córnea (FERNANDES et al., 2004; HERMANN et al., 2004; TOMA et al., 2005; UCHIDA et al., 2005). Experimentos prévios do nosso laboratório, em embriões de codornas, utilizando os fatores de crescimento EGF e FGF2 sugeriram que o EGF é capaz de conduzir a diferenciação das células da CN para o fenótipo neuronal e melanocítico quando o tratamento é realizado nas fases iniciais da cultura, o que pode indicar um efeito do EGF sobre os progenitores mais indiferenciados da CN (GARCEZ et al., 2009). Por outro lado, o FGF2 parece manter as células da CN em um estado indiferenciado e com alta capacidade de proliferação celular. Os mecanismos celulares ainda não são totalmente esclarecidos, porém estes fatores parecem promover a proliferação das células indiferenciadas e/ou interferir no processo de diferenciação das células da CN.

O FGF2 é conhecido pelos seus efeitos em progenitores neuronais do sistema nervoso central (MCKINNON et al., 1990) e vários experimentos têm demonstrado que é um mitógeno importante para a manutenção de proliferação dessas células multipotentes in vitro (GRITTI et al., 1996; TROPEPE et al., 1999). No entanto, o envolvimento de FGF2 na multipotencialidade e autorrenovação da CN é desconhecido. Em nosso estudo, foram utilizadas séries de culturas clonais e de massa que mostraram o efeito FGF2 em aumentar a proporção

dos progenitores multipotentes da CN embrionária. Além disso, FGF2 estimulou a autorrenovação e capacidade de propagação das células bipotentes Glia-Músculo Liso, que assim podem ser consideradas células-tronco. Estes dados têm significativas implicações no desenvolvimento do CN e suas estruturas derivadas. Em conjunto, esses experimentos de ensaios clonais e de subclonagem demonstraram a capacidade de autorrenovação de células da CN evidenciando sua característica de verdadeiras células-tronco.

Em adição, células do folículo piloso de camundongos adultos contêm populações de células-tronco dentre as quais similares à CN. As células-tronco do folículo piloso apresentam a capacidade de se diferenciar *in vitro* para a maioria dos derivados da CN, sendo assim fortes candidatas para futuras terapias celulares regenerativas (FERNANDES et al., 2004; SIERBER-BLUM et al., 2004, TOMA et al., 2005; YU et al., 2010). O presente estudo corrobora esses achados e demonstra o importante papel do microambiente, especialmente do FGF2 e do EGF em promover a proliferação, manutenção e influenciar na diferenciação das células semelhantes à CN de folículo piloso.

As descobertas de precursores multipotentes em tecidos adultos de fácil acesso como a pele, são bastante promissoras, correspondendo à base de terapias celulares e do desenvolvimento de processos biotecnológicos inovadores. Entretanto, de acordo com ULLOA-MONTOYA et al. (2005), a identificação de fontes acessíveis de células tronco em tecidos adultos, a implementação de tecnologias com propósitos terapêuticos requer o desenvolvimento de metodologias para cultivo e propagação que permitam a manutenção da multipotencialidade e da capacidade de autorrenovação dessas células. A pesquisa básica com células-tronco compreende a identificação de marcadores associados à multipotencialidade e/ou capacidade de autorrenovação das células. Nesse trabalho avaliamos a potencialidade e a autorrenovação das células da CN embrionária de aves e células adultas semelhantes à CN de camundongos e demosramos o efeito de EGF e FGF na proliferação e diferenciação destas células. Estes dados podem levar a compreensão dos mecanismos biológicos que estão envolvidos nestes processos.

Embora não tenhamos realizado até o momento ensaios que comprovem o real potencial de diferenciação das células de

folículo piloso, nossos resultados sugerem que a metodologia aqui empregada (tratamento com os fatores FGF2/EGF) pode ser uma alternativa na obtenção de células autólogas, que podem ser úteis no tratamento de diversas doenças e traumas.





## 8 CONCLUSÕES

- FGF2 estimula a renovação e proliferação dos precursores mais indiferenciados e multipotentes da CN embrionária mantendo-os indiferenciados;
- FGF2 promove a autorrenovação do precursor bipotente Glia-Músculo Liso, em células da CN embrionárias que podem ser consideradas células-tronco. O folículo piloso de camundongos adultos contém células que expressam, in vitro, marcadores característicos de células da CN;
- FGF2 e EGF estimulam a proliferação e manutenção e influenciam a diferenciação de células semelhantes à CN de folículo piloso, podendo ser úteis como protocolo de obtenção dessas células para futuro uso terapêutico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABZHANOV, A.; TZAHOR, E.; LASSAR, A.; TABIN, C. (2003): **Dissimilar regulation of cell differentiation in mesencephalic (cranial) and sacral (trunk) neural crest cells in vitro.** Development 130: 4567-79.

ADOLPHE, C.; NARANG, M.; ELLIS, T.; WICKING, C.; KAUR, P.; WAINWRIGHT, B. (2004): **An in vivo comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog reveals that hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis.** Development, v. 131, n. 20, p. 5009-19.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. (2002): **Neurogenesis in adult subventricular zone.** J, Neuroscience, v. 22, n. 3, p. 629-34.

AMOH, Y.; Li, L.; KATSUOKA, K.; Hoffman, R.M. (2008): **Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function.** Cell Cycle 7(12): 1865-1869.

ANDERSON, D. J. (1989): **The neural crest cell lineage problem: neuropoiesis?** Neuron. v.3, n.1, Jul, p.1-12.

BAREMBAUM, M.; BRONNER-FRASER, M. (2005): **Early steps in neural crest specification.** Semin. Cel.l Dev. Biol. 16: 642-46.

BRONNER-FRASER, M.; LE DOUARIN, N. (2012): **Development and evolution of the neural crest: An overview.** Developmental Biology. v. 300 (1): 1-2.

BITTENCOURT, D. A. (2007): **Efeito do FGF2 na diferenciação de células da crista neural truncal (CNT) de codornas *in vitro*.** 64 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.



CALLONI, G. W., GLAVIEUX-PARDANAUD, C., LE DOUARIN, N. M. E DUPIN, E. (2007): **Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.50, Dec 11, p.19879-84.

CALLONI G. W, LE DOUARIN N. M, DUPIN E. (2009): **High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic and osteogenic differentiation capacities.** Proc Natl Acad Sci USA 106:8947-52.

COSTA-SILVA, B., DA COSTA, M. C., MELO, F. R., NEVES, C. M., ALVAREZ-SILVA, M., CALLONI, G. W. E TRENTIN, A. G.(2009): **Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential.** Exp Cell Res, v.315, n.6, Apr 1, p.955-67.

COURA, G.S., GARCEZ, R.C., DE AGUIAR, C.B., ALVAREZ-SILVA, M., MAGINI, R.S., AND TRENTIN, A.G. (2008): **Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells.** J Periodontal Res 43, 531–536.

DELFINO-MACHIN, M.; CHIPPERFIELD, T. R.; RODRIGUES, F. S.; KELSH, R. N. (2007): **The proliferating field of neural crest stem cells.** Dev Dyn, v. 236, n. 12, p. 3242-54.

DUARTE, B. D. P. (2010): **Avaliação do potencial de diferenciação das células da polpa dentária de humanos.** 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DUPIN, E.; CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M. (2010): **The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities.** Cell Cycle, jan, 9(2):238-49.

DUPIN, E.; REAL, C.; LE DOUARIN, N. (2001): **The neural crest stem cells: control of neural crest cell fate and plasticity by endothelin-3**. An. Acad. Bras. Cienc.73 (4): 533-45.

DUPIN, E.; REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; VAIGOT, P.; LE DOUARIN, N. (2003): **Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages : Transition from Schwann cells to glial- melanocytic precursors *in vitro***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 5229-33.

FERNANDES, K.J.; MCKENZIE, I.A.; MILL, P.; SMITH, K.M.; AKHAVAN, M.; BARNABÉ-HEIDER, F.; BIERNASKIE, J.; JUNEK, A.; KOBAYASHI, N.R.; TOMA, J.G.; KAPLAN, D.R.; LABOSKY, P.A.; RAFUSE, V.; HUI, C.C; MILLER, F.D. (2004). **A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells**. Nature Cell Biology. 6: 1082–1093.

FERNANDES, K.J.; TOMA, J.G.; MILLER, F.D. (2007): **Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential**. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 363: 185-198.

GAMMILL, L.S.; BRONNER-FRASER, M. (2003). **Neural crest specification: migrating into genomics**. Nature Reviews Neuroscience 4, 795-805.

GARCEZ, R. C.; TEIXEIRA, B. L.; SCHMITT, S. S.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. (2009): **Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes**. Cellular and Molecular Neurobiology. , v.29, p.1087 – 1091.

GILBERT, S.F. (2000): **Developmental Biology** (6th ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.

GILBERT, S. F. (2003): **Developmental biology** (7th ed.). Sunderland, MA.: Sinauer Associates.

GOLDING, J. P.; TRAINOR, P.; KRUMLAUF, R.; GASSMANN, M. (2000): **Defects in pathfinding by cranial neural crest cells**

**in mice lacking the neuregulin receptor ErbB4.** *Nature Cell Biology*. 2(2): 103-109.

GRITTI, A.; PARATI, E. A.; COVA, L.; FROLICHSTHAL, P.; GALLI, R.; WANKE, E.; FARAVELLI, L.; MORASSUTTI, D. J.; ROISEN, F.; NICKEL, D.D.; VESCOVI, A. L. (1996): **Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor.** *The Journal of Neuroscience*, 16(3):1091-1100.

HALL, B.K. (2009): **The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution** (2 ed.). Canada: Hardcover.

HERMANN, A.; GASTL, R.; LIEBAU, S.; POPA, M. O.; FIEDLER, J.; BOEHM, B. O.; MAISEL, M.; LERCHE, H.; SCHWARZ, J.; BRENNER, R.; STORCH, A. (2004): **Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells.** *J Cell Science*, v. 117, n. Pt 19, p. 4411-22.

JEREMIAS, T.S. (2009): **Efeito dos fatores FGF2, EGF e  $\beta$ -Catenina no potencial de diferenciação das células tronco mesenquimais de placenta humana.** Dissertação de Mestrado em Neurociências - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. (2004). **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

KALCHEIM, C. (1989). **Basic fibroblast growth factor stimulates survival of nonneuronal cells developing from trunk neural crest.** *Dev Biol* 134:1–10.

KALCHEIM, C.; NEUFELD, G. (1990): **Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early avian embryos.** *Development* 109: 203-15.

KANEMURA, Y.; MORI, H.; KOBAYASHI, S.; ISLAM, O.; KODAMA, R.; YAMAMOTO, A.; NAKANISHI, Y.; ARITA, N.; YAMASAKI, M.; OKANO, H.; HARA, M.; MIYAKE, J. (2002): **Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of**



**viable cells based on cellular metabolic activity.** Journal of Neuroscience Research. 69: 869–879.

KILPATRICK, T. J.; BARTLETT, P. F. (1995). **Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF.** The Journal of Neuroscience. 15(5): 3653-3661.

KRUGER, G.M., MOSHER, J.T., BIXBY, S., JOSEPH, N., IWASHITA, T., AND MORRISON, S.J. (2002): **Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness.** Neuron 35, 657–669.

LAVKER, R.M.; SUN, T.T. (2000). **Epidermal stem cells: properties, markers, and location.** Proceedings of National Academy Sciences 97: 13473– 13475.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L.B.; MCKAY, R.D. (1990). **CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.** Cell. 60: 585–595.

LE DOUARIN, N.M.; KALCHEIM, C.(1999): **The Neural Crest.** 2 Ed. New York: Cambridge Univ. Press.

LE DOUARIN, N.; CREUZET, S.; COULY, G.; DUPIN, E. (2004): **Neural crest cell plasticity and its limits.** Development 131: 4637-50.

LEE, G.; KIM, H.; ELKABETZ, Y.; SHAMY, G.; PANAGIOTAKOS, G.; BARBERI, T.; TABAR, V.; STUDER, L. (2007): **Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells.** Nature Biotechnology 26(7): 831.

LI, H.Y., SAY, E.H., AND ZHOU, X.F. (2007): **Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia.** Stem Cells 25, 2053–2065.

LIN, H., LIU, F., ZHANG, C., ZHANG, Z., GUO, J., REN, C., KONG, Z. (2009): **Pluripotent hair follicle neural crest stem-cell-derived neurons and schwann cells functionally repair sciatic nerves in rats.** *Mol. Neurobiol.* 40(3):216-23

MCKINNON, R. D.; MATSUI, T.; DUBOIS-DALCQ, M.; AARONSON, S. A. (1990): **FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development.** *Neuron* 5: 603-14.

MEULEMANS, D.; BRONNER-FRASER, M. (2004). **Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development.** *Developmental Cell.* 7: 291-299.

MILETICH, I.; SHARPE, P. T. (2004): **Neural crest contribution to mammalian tooth formation.** *Birth Defects Res C Embryo Today*, v. 72, n. 2, p. 200-12.

MOSHER, J.T., YEAGER, K.J., KRUGER, G.M., JOSEPH, N.M., HUTCHIN, M.E., DLUGOSZ, A.A., AND MORRISON, S.J. (2007): **Intrinsic differences among spatially distinct neural crest stem cells in terms of migratory properties, fate determination, and ability to colonize the enteric nervous system.** *Dev Biol* 303, 1–15.

MORRISON, S. J., WHITE, P. M., ZOCK, C. E ANDERSON, D. J. (1999): **Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells.** *Cell*, v.96, n.5, Mar 5, p.737-49.

MURPHY, M.; REID, K; FORD, M; FURNESS, J.B; BARTLETT, P.F. (1994): **FGF2 regulates proliferation of neural crest cells with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors.** *Development* 120: 3519-28.

NISHIMURA, E.K.; JORDAN, S.A.; OSHIMA, H.; YOSHIDA, H.; OSAWA, M.; MORIYAMA, M.; JACKSON, I.J.; BARRANDON, Y.; MIYACHI, Y.; MISHIKAWA, S. (2002). **Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination.** *Nature* 416: 854–860.

NONES, J.; COSTA, A. P.; LEAL, R. B.; GOMES, F. C.; TRENTIN, A. G. (2012): The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. *Cell Tissue Res.* 350: 305-315.

OHYAMA, M. (2007): **Hair follicle bulge: A fascinating reservoir of epithelial stem cells.** *Journal of Dermatological Science.* 46, 81—89.

OTA, M; ITO, K. (2006): **BMP e FGF-2 regulates neurogenin-2 expression and the differentiation of sensory neurons and glia.** *Dev. Dyn.* 235:646-655.

PALMER, T. D.; MARKAKIS, E. A.; WILLHOITE, A. R.; SAFAR, F; GAGE, F. H. (1999): **Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS.** *J. Neuros.* 19: 8487-97.

PEREIRA, R. M.(2011): **Caracterização do folículo piloso como nicho de células progenitoras neurais e epidermais em camundongos.** 66f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

POLLI, V. A. B.; DUARTE, B. D.P.; JEREMIAS, T. S.; VISONI, S.; COURA, G. S.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. (2013): **Human dental pulp: a potential niche for ectomesenchymal stem cells.** Submetido.

REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N.; DUPIN, E. (2006): **Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potencial.** *Dev. Biol.* 300: 656-69.

ROGERS, C.D.; JAYASENA, C.S.; NIE, S.; BRONNER, M.E. (2012): **Neural crest specification: tissues, signals, and transcription factors.** *Developmental Biology.* 1:52–68.2012

SARKAR, S.; PETIOT, A.; COPP, A.; FERRETTI, P.; THOROGOOD, P. (2001): **FGF2 promotes skeletogenic**

**differentiation of cranial neural crest cells.** Development 128: 2143-52.

SHERMAN, L.; STOCKER, K.; MORRISON, R.; CIMENT, G. (1993): **Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-Schwann cell precursors into melanocytes.** Development 118: 1313-26.

SIEBER-BLUM, M., GRIM, M., HU, Y.F., AND SZEDER, V. (2004): **Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle.** Dev Dyn 231, 258–269.

SNIDER, P.; OLAOPA, M.; FIRULLI, A. B.; CONWAY, S. J. (2007): **Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage.** Scientific World Journal. 7: 1090-113.

STEMPLE, D. L. E ANDERSON, D. J. (1992): **Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest.** Cell, v.71, n.6, Dec 11, p.973-85.

STEVENTON, B.; CARMONA-FONTAINE, C.; MAYOR, R. (2005): **Genetic network during neural crest induction: From cell specification to cell survival.** Semin. Cell. Dev. Biol. 1084-9521.

TAYLOR, G.; LEHRER, M.S.; JENSEN, P.J.; SUN, T.T.; LAVKER, R.M. (2000): **Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis.** Cell. 102: 451–461.

TEIXEIRA, B. L. (2009): **Análise dos efeitos do EGF e do FGF2 sobre a diferenciação das células da crista neural truncal de codornas, *in vitro*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TEIXEIRA, B. L. (2011): **Análise dos efeitos do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) na potencialidade e diferenciação das células da crista neural de aves.** Dissertação de Mestrado em Neurociências - Centro de Ciências

Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,  
Florianópolis.

TOMA, J.G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K.J. BARNABÉ-HEIDER, F.; SADIKOT, A.; KAPLAN, D.R.; MILLER, F.D. (2001). **Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin.** *Nature Cell Biology*. 3: 778–784.

TOMA, J. G.; MCKENZIE, I. A.; BAGLI, D.; MILLER, F. D. (2005): **Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin.** *Stem Cells*, v. 23, n. 6, p. 727-37.

TRENTIN, A., GLAVIEUX-PARDANAUD, C., LE DOUARIN, N. M. E DUPIN, E. (2004): **Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.13, Mar 30, p.4495-500.

TRENTIN, A.G.; CALLONI, G. W. (2012). **The Neural Crest and the Stem Cells of Neural Crest.** In: REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG; ANTONIO CARLOS CAMPOS DE CARVALHO. (Org.). *Resident stem cells: the key to regenerative therapy*. 1ed.Oxford: Elsevier, v. 1, p. 157-176.

TROPEPE, V.; SIBILIA, M.; CIRUNA, B. G.; ROSSANT, J.; WAGNER, E. F.; VAN DER KOOY, D. (1999): **Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon.** *Dev. Biol.* 208: 166-88.

TUMBAR, T.; GUASCH, G.; GRECO, V.; BLANPAIN, C.; LOWRY, W. E.; RENDL, M.; FUCHS, E. (2004): **Defining the epithelial stem cell niche in skin.** *Science*, v. 303, n. 5656, p. 359-63.

ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C.M.; HU, W. (2005): **Culture systems for pluripotent stem cells.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100: 12-27.

UCHIDA, S.; YOKOO, S.; YANAGI, Y.; USUI, T.; YOKOTA, C.; MIMURA, T.; ARAIE, M.; YAMAGAMI, S.; AMANO, S. (2005.): **Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells in vitro.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 46, n. 5, p. 1620-5.

WHITE, P.M., MORRISON, S.J., ORIMOTO, K., KUBU, C.J., VERDI, J.M., AND ANDERSON, D.J. (2001): **Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals.** *Neuron* 29, 57–71.

WONG, C.E.; PARATORE, C.; DOURS-ZIMMERMANN, M.T.; ROCHAT, A.; PIETRI, T.; SUTER, U.; ZIMMERMANN, D.R.; DUFOUR, S.; THIERY, J.P.; MEIJER, D.; BEERMANN, F.; BARRANDON, Y.;

SOMMER, L. (2006): **Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin.** *Journal of Cell Biology*. 175:1005–1015.

YOSHIDA, S.; SHIMMURA, S.; NAGOSHI, N.; FUKUDA, K.; MATSUZAKI, Y.; OKANO, H.; TSUBOTA, K. (2006). **Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea.** *Stem Cells*. 24: 2714–2722.

YU, H.; KUMAR, S.M.; KOSSENKOV, A.V.; SHOWE, L.; XU, X. (2010): **Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles.** *Journal of Investigative Dermatology*. 130: 1227-1236.